



Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene  
des Universitätsklinikums Rostock  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski



**Simultane Detektion  
von atypischen Pneumonieerregern  
und *Mycobacterium tuberculosis*  
mittels Multiplex-Real-Time-PCR  
und TaqMan-Sonden**

Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von  
Christina Anja Wolkowicz  
geboren am 27.03.1983  
in Berlin

2011

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger  
Studiendekan: Prof. Dr. med. Thomas Mittlmeier

urn:nbn:de:gbv:28-diss2011-0196-5

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski

2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Junghanß

3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Stephan Becker

Datum der Promotionsverteidigung: 11.05.2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1	Epidemiologie .....	5
1.2	Die Pneumonie .....	6
1.3	Krankheitsbilder, Diagnostik und Therapie.....	7
1.4	Erreger und erregerspezifische Diagnostik .....	10
1.4.1	Mykobakterien .....	11
1.4.2	Chlamydien.....	15
1.4.3	Mykoplasmen .....	17
1.4.4	Legionellen .....	19
1.5	Die PCR zur Diagnostik erregerspezifischer Nukleinsäuren.....	22
1.5.1	Prinzip.....	22
1.5.2	Real-Time-PCR .....	24
1.6	Qualitätskontrolle durch $\beta$ -Globin .....	27
1.7	Problemstellung und Zielsetzung .....	27
1.7.1	Kombinierter Nachweis .....	27
1.7.2	Aufgabenstellung und Konzept .....	28
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>31</b>
2.1	Klinische Proben und Referenzmaterial.....	31
2.1.1	Patientenmaterial.....	31
2.1.2	Rekombinante Plasmide.....	32
2.1.3	Referenzstämme .....	32
2.2	Grundlagen .....	33
2.2.1	Anforderungen an Zielsequenzen, Primer und Sonden .....	33
2.2.2	Zielgene .....	34
2.2.3	Fluoreszenz und Farbstoffe .....	35
2.3	DNA-Präparation.....	36
2.3.1	Prinzip.....	36
2.3.2	Vorbereitende Dekontamination .....	37
2.3.3	Durchführung .....	37
2.4	Real-Time-PCR .....	38
2.4.1	Primer und TaqMan-Sonden .....	38
2.4.2	Mastermix und Übertragbarkeit auf andere Real-Time-Systeme .....	39
2.4.3	Durchführung der Standard-Real-Time-PCR.....	40
2.4.4	Temperaturprofil .....	43
2.4.5	Bewertung .....	44
2.5	Weitere Verfahren .....	45
2.5.1	Vergleichende Methodik .....	45
2.5.2	Gelelektrophorese .....	45
2.5.3	Schmelzkurvenanalyse .....	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
3.1	Einzelnachweise.....	47
3.1.1	Generierung und Prüfung von Primern und Sonden .....	47
3.1.2	Matrix-Effekt .....	51
3.1.3	Sonden und TaqMan-Farbstoffe .....	52

<b>3.2</b>	<b>Kombinierte Verfahren.....</b>	<b>54</b>
3.2.1	Duale Detektion.....	54
3.2.2	Zeitaufwand.....	56
3.2.3	Besonderheiten beim Nachweis von Legionellen .....	56
<b>3.3</b>	<b>Analyse von Patientenmaterial.....</b>	<b>60</b>
<b>3.4</b>	<b>Externe und interne Validierung .....</b>	<b>60</b>
3.4.1	Analytische Sensitivität und Spezifität .....	61
3.4.2	Detektionsgrenzen .....	63
3.4.3	Präzision, Richtigkeit, Linearität .....	65
3.4.4	Kreuzreaktionen mit der DNA anderer Bakterien .....	67
3.4.5	Effizienz .....	73
<b>3.5</b>	<b>Kasuistik Mykoplasmen-Pneumonie .....</b>	<b>74</b>
<b>4</b>	<b><i>Diskussion .....</i></b>	<b>77</b>
<b>5</b>	<b><i>Zusammenfassung .....</i></b>	<b>94</b>
<b>6</b>	<b><i>Literaturverzeichnis.....</i></b>	<b>96</b>
<b>7</b>	<b><i>Abkürzungsverzeichnis .....</i></b>	<b>107</b>
<b>8</b>	<b><i>Abbildungsverzeichnis .....</i></b>	<b>109</b>
<b>9</b>	<b><i>Tabellenverzeichnis .....</i></b>	<b>110</b>
<b>10</b>	<b><i>Materialübersicht und Herstellerverzeichnis .....</i></b>	<b>111</b>
<b>11</b>	<b><i>Anhang .....</i></b>	<b>113</b>
11.1	Danksagungen .....	113
11.2	Thesen.....	114
11.3	Eidesstattliche Erklärung .....	115

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie

Erkrankungen der Lunge sind für ein erhebliches Maß an Morbidität und Mortalität bei Kindern und Erwachsenen verantwortlich und stehen nach WHO-Angaben mit 7,1 % weltweit an dritter Stelle der Mortalitätsursachen, in Ländern mit niedrigem Einkommen mit 11,2 % sogar an erster Stelle [1, 2]. Global spielen dabei Pneumonien und Tuberkulose als Infektionserkrankungen eine zentrale Rolle [3].

Die meisten pulmonalen Infektionen werden außerhalb von Krankenhäusern erworben. Nach Angaben des CAPNET (Kompetenznetz ambulant erworbene Pneumonie) liegt die Letalität der ambulant erworbenen Pneumonien (community acquired pneumonia, CAP) bei ca. 1 % im ambulanten Bereich, während es stationär bis zu 20 % sind [4, 5].

Infektionen durch Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTK) gehören mit einer Inzidenz von ca. 9,2 Millionen Menschen, ca. 1,7 Millionen Toten jährlich und einer geschätzten Prävalenz der symptomatischen Infektion von 14,4 Millionen Menschen (219/100.000 Einwohner) nach WHO-Angaben global an die achte Stelle der häufigsten Todesursachen [6].

Eine wichtige Bedeutung hat die Tuberkulose im Zusammenhang mit HIV-Infektionen erhalten. Die weltweite Inzidenz der Kombination Tuberkulose mit HIV liegt bei ca. 0,7 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr und die jährliche Letalität bei ca. 0,2 Millionen Menschen [2, 6]. Nach Angaben der WHO stellt sie in Afrika die häufigste Todesursache bei AIDS-Kranken dar.

Seit 1984 durchliefen *M.-tuberculosis*-Infektionen in Europa eine Renaissance. In diesem Zusammenhang spielen Reaktivierungen bei Patienten mit latenter Tuberkulose durch einen geschwächten Immunstatus, z. B. durch HIV-Infektion, Alkoholismus oder sehr hohes Lebensalter und Migrationsbewegungen aus Ländern mit höheren Inzidenzraten eine wichtige Rolle [7]. Aufgrund der großen Anzahl latent infizierter Menschen (ca. 1,5 Milliarden weltweit) sollte die Diagnostik respiratorischer Materialien bei entsprechendem Verdacht neben den virulenten

atypischen Erregern auch Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes differentialdiagnostisch umfassen.

## 1.2 Die Pneumonie

Unter einer Pneumonie versteht man die entzündliche Veränderung des Lungengewebes aufgrund exogener oder endogener Ursachen. Pneumonien lassen sich anhand folgender Kriterien systematisieren:

### Ätiologie

- chemisch
- immunologisch
- infektiös
- physikalisch
- toxisch

### Chronologie

- akut
- chronisch
- subakut

### Erregerspezifische Einteilung

- bakteriologisch
- mykotisch
- viral

### Lokalisation der Infektion im Gewebe

- Bronchiopneumonie
- Interstitielle Pneumonie
- Lobärpneumonie

### Ort des Erwerbens der Infektion

- ambulant erworben = CAP  
(community acquired pneumonia)
- stationär erworben = NAP  
(nosocomial acquired pneumonia)

### Prädisposition

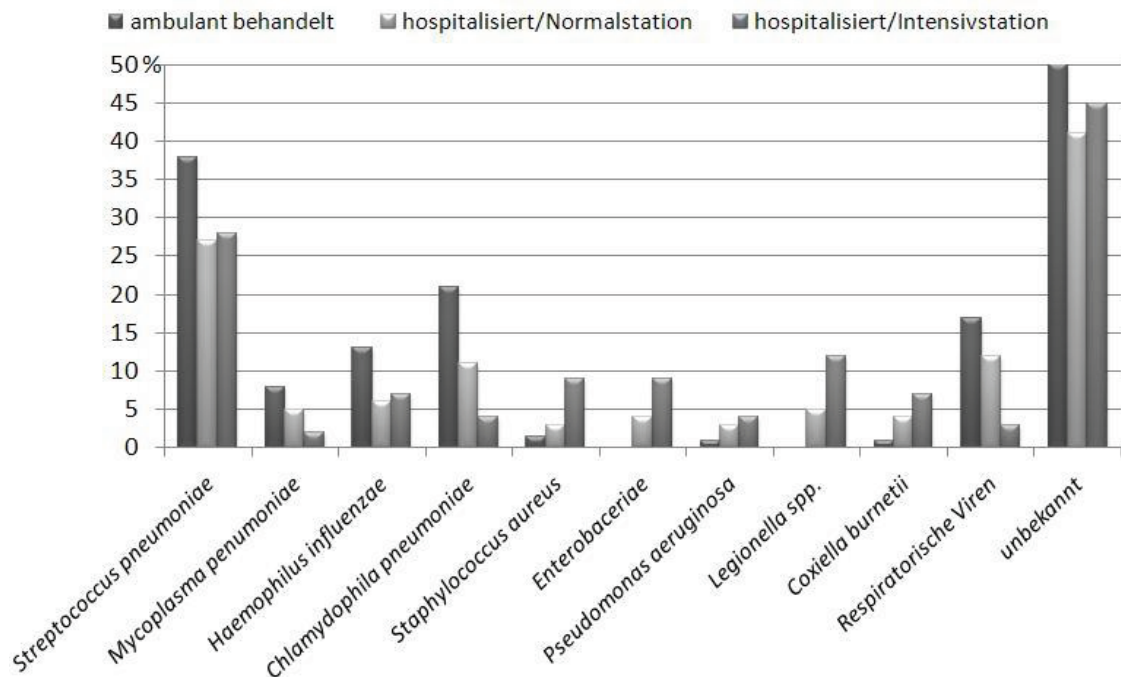
- primär
- sekundär

Bronchio-pulmonale Infektionen stehen weltweit an dritter Stelle der Letalitätsursachen im Krankenhaus und stellen auch im ambulanten Bereich ein großes Problem dar. Dabei ist neben Viren und Pilzen eine Vielzahl von Bakterien für Lungenentzündungen verantwortlich (Abbildung 1).

Der häufigste nachgewiesene Erreger für typische ambulant erworbene Pneumonien ist *Streptococcus pneumoniae* mit 31 %. Allerdings bleiben die Erreger in 40–50 % der Fälle unbekannt [5].

Ca. 24 % der ambulant erworbenen Pneumonien in Europa werden nach Angaben der AWMF-S3-Leitlinie von sogenannten atypischen Pneumonieerregern wie *Chlamydophila pneumoniae* (ca. 12 %), *Mycoplasma pneumoniae* (ca. 5 %) und *Legionella*-Spezies (ca. 7 %) (insb. *Legionella pneumophila*) verursacht [5]. Spezielle Virulenzfaktoren machen diese Erreger in besonderer Weise potent, so können

*C.-pneumonia*-Bakterien bzw. *M.-pneumonia*-Bakterien sich über die mechanische Abwehr des Körpers hinwegsetzen, indem sie einen ziliostatischen Faktor produzieren bzw. Zilien abscheren können. *Legionella* spp. sind resistent gegenüber der Aktivität von Phagozyten [8-10].



**Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung von Pneumonieerregern**

Dargestellt sind die häufigsten Pneumonieerreger in den Kategorien ambulanter, stationärer und intensivmedizinischer Bereich.

Quelle: nach Angaben der S3-Leitlinie der CAPNET, 2005 [5]

Die Häufigkeit dieser auch als atypische Pneumonieerreger bezeichneten Bakterien wird aufgrund von Schwierigkeiten der zeitgerechten Diagnostik jedoch vermutlich stark unterschätzt [5, 11].

### 1.3 Krankheitsbilder, Diagnostik und Therapie

Im Allgemeinen basiert die Diagnose einer Erkrankung auf den Details der klinischen Symptomatik sowie auf den Ergebnissen aus den bildgebenden Verfahren und Laboruntersuchungen. Eine daraus abgeleitete adäquate Therapie kann zur raschen klinischen Besserung führen und dabei die Hospitalisierungszeit und Behandlungskosten deutlich vermindern.

Eine typische Pneumokokken-Pneumonie äußert sich meist in einer vermehrten eitrigen Schleimproduktion, Fieber, Kopfschmerzen und produktivem Husten. Die Laborwerte zeigen oft einen Anstieg an Entzündungsparametern, insb. von Granulozyten, C-reaktivem Protein (CRP), Procalcitonin und der Blutkörperchen-Senkungs-Geschwindigkeit.

Das klinische Bild einer atypischen Pneumonie ist dagegen weniger spezifisch. Häufige Symptome sind Apathie, Bradykardie, Lethargie, Kopfschmerzen, Müdigkeit, allgemeine Schwäche oder Stupor. Initial ist die Erkrankung meist nicht schmerzhaft und kann auch extrapulmonale Lokalisationen betreffen. Typische Befunde im Blutbild wie CRP-Anstieg oder Leukozytose können fehlen oder nur grenzwertig vorhanden sein; eine Diskriminierung zwischen den einzelnen atypischen Pneumonierregern aufgrund des klinischen Bildes ist nahezu unmöglich. Die klinische Symptomatik korreliert ggf. auch nicht mit einer Erregerlast. Besonders bei Kindern, älteren Patienten und Immunsupprimierten werden die atypischen Infektionen wegen milder oder unauffälliger B-Symptomatik daher oft verkannt.

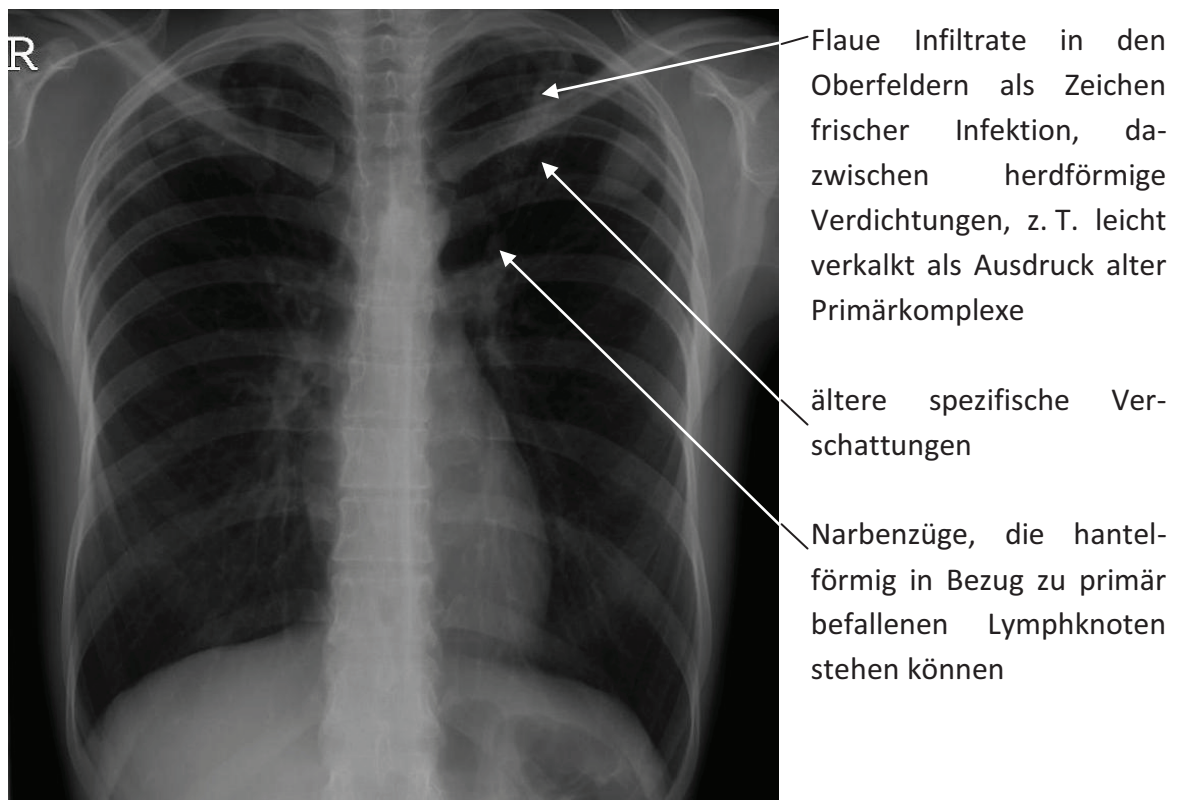
Bildgebende Verfahren, insb. die verschiedenen Röntgentechniken, unterstützen die Differenzierung zwischen den verschiedenen atypischen Erregern. Eine *C.-pneumoniae*-Infektion zeigt sich meist in einseitigen, subsegmentalen und bevorzugt alveolären Verschattungen. Bei Mykoplasmen-Befall dagegen ist die Lunge meist bilateral mit fein retikulärer bis retikulonodulärer Zeichnung diffus interstitiell oder alveolär infiltriert. Das Bronchioaerogramm ist oft positiv (vgl. Patienten-Kasuistik 3.5, S. 74).

Die Legionellen-Pneumonie äußert sich mit oft rechtsseitigem Beginn mit eher peripheren, multifokalen, panlobulären Infiltraten, die schnell konfluieren und sich im Röntgenbild als Verschattung darstellen. Bevorzugt sind die Unterfelder beider Lungenflügel befallen und gehen in 3–50 % der Fälle früh mit einem Pleuraerguss einher [12]. Hier kann der pathologische Lungenbefund trotz Abklingen der klinischen Symptome bis zu acht Wochen lang persistieren. Außer bei Kindern ist die Darstellung der mediastinalen Lymphknoten in den bildgebenden Verfahren bei Infektionen durch die drei genannten atypischen Pneumonieerreger fast immer unauffällig.



Zwar gibt es eindeutige diagnostische Kriterien, die im Röntgen-Thorax auf eine Tuberkulose hinweisen, im Einzelfall ist die Abgrenzung von anderen pulmonalen Erkrankungen allein aufgrund des Röntgenbildes jedoch sehr schwierig.

Typisch sind je nach Stadium ein „mottenfraßartiger“ Befall, solide (verkalkte) Rundherde in den Unterfeldern mit Lymphadenitis bei Primärbefall, später auch mit schollig verkalkten Lymphknoten, Simon-Spitzenherden, Assmann-Infiltraten, Atelektasen, Ghon-Herden (verkalkte Granulome) und Kavernen (Abbildung 2, Abbildung 3). Allerdings reicht kein Befund aus einem der bildgebenden Verfahren aus, um allein daraus die infektiologische Ätiologie einer pathologischen Lungenveränderung zu belegen [6].



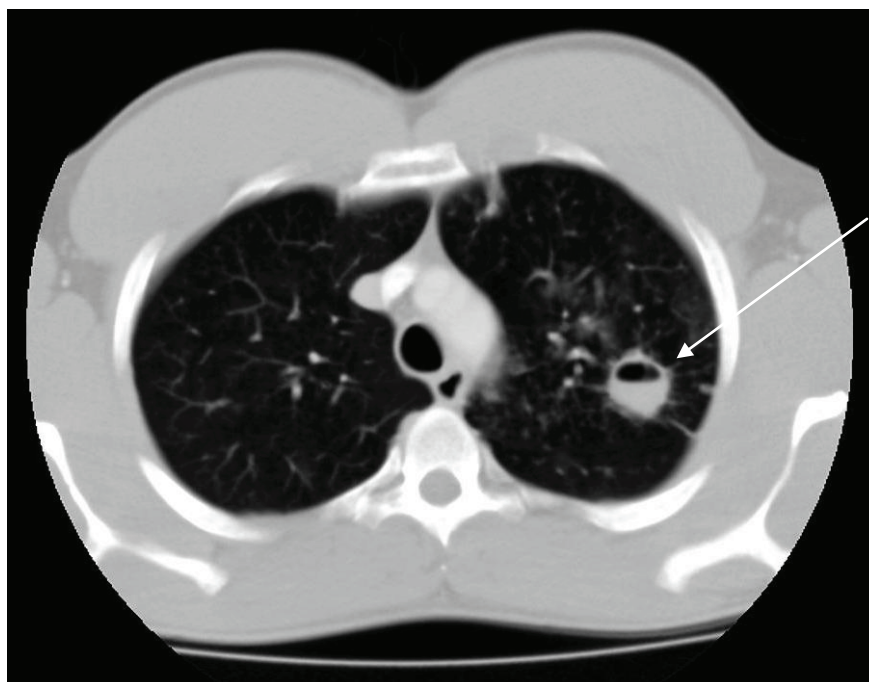
**Abbildung 2: Röntgen-Thoraxaufnahme p. a. einer 32-jährigen TB-Patientin**

*(mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. K. Hauenstein, Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universität Rostock)*

Die Therapie von Lungeninfektionen umfasst neben allgemeinen Maßnahmen zur Entzündungshemmung und Verbesserung der Lungenfunktion die Gabe einer erregerspezifischen, medikamentösen antibiotischen Therapie.

Bei von Chlamydien, Mykoplasmen und Legionellen verursachten Infektionen werden derzeit vor allem Makrolide wie Azithromycin oder Erythromycin empfohlen [13]. Nach neueren Erkenntnissen sind 3.- und 4.-Generations-Fluorchinolone (z. B. Levofloxacin, Moxifloxacin) adäquat wirksam [14-16].

Aufgrund der rasch möglichen Resistenzentwicklung schreiben die aktuellen Leitlinien für Tuberkulose eine sechsmonatige Kombinationstherapie mit mindestens vier der folgenden Antituberkulotika Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid, Ethambutol und Streptomycin vor.



Deutliche Kaverne im linken Oberlappen bei einem Patienten mit Sekundärtuberkulose. Die Spiegelbildung spricht für einen eitrigen Inhalt der Kaverne.

**Abbildung 3: CT-Thorax-Aufnahme eines 29-jährigen Tuberkulosepatienten**

*(mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. K. Hauenstein, Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universität Rostock)*

## 1.4 Erreger und erregerspezifische Diagnostik

Im folgenden Abschnitt werden die verschiedenen untersuchten bakteriellen Erreger in Kürze vorgestellt. Dabei werden wichtige mikrobiologische, epidemiologische und klinische Faktoren aufgeführt, die zum Verständnis für die im Anschluss dargestellten diagnostischen Verfahren und ihre Grenzen essentiell sind.

### 1.4.1 Mykobakterien

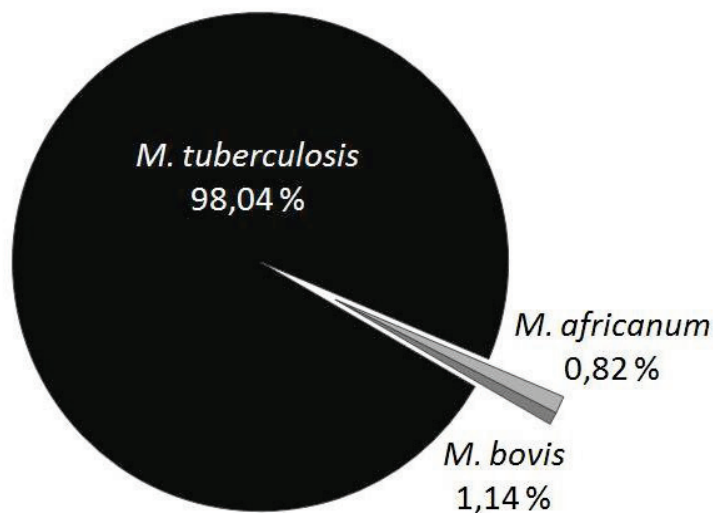
#### MIKROBIOLOGISCHE UND EPIDEMIOLOGISCHE CHARAKTERISTIKA

Bakterien der Familie *Mycobacteriaceae* sind gerade bis leicht gekrümmte, unbewegliche aerobe Stäbchen mit einer Größe von  $0,2\text{--}0,6 \times 1,0\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$ . Man unterscheidet zwischen *M. leprae*, sogenannte „MOTT“ (Mycobacteria other than tuberculosis) und Vertretern des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTK).

Zu letzteren gehören:

- *M. tuberculosis*
- *M. bovis*
- *M. africanum*
- *M. microti*
- *M. caprae*

Abbildung 4 stellt die anteilmäßige Verteilung der MTK-Vertreter in Deutschland dar. Dabei ist ersichtlich, welcher großer Anteil durch *M. tuberculosis* eingenommen wird.

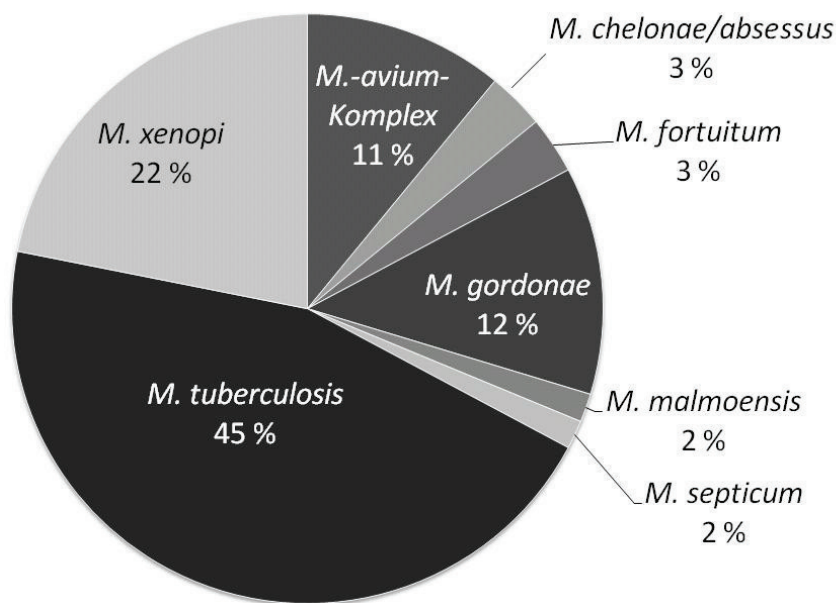


**Abbildung 4: Relative Anteile der Vertreter des M.-tuberculosis-Komplexes in symptomatischen MTK-bedingten Atemwegserkrankungen in Deutschland (Stand 2006)**

Quelle: Robert Koch Institut 2006 [17]

Eine wichtige Differenzialdiagnose aller respiratorischen Erkrankungen ist die Infektion mit Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes.

Nach Runyon werden Mykobakterien anhand ihrer Wachstumsgeschwindigkeit und ihres Pigmentationsverhaltens in vier Gruppen eingeteilt, wobei *M. tuberculosis* der Runyon-Gruppe III (langsam wachsend, kein Pigment bildend) zugeordnet wird [18]. Da auch andere Mykobakterien respiratorische Infektionen verursachen können, ist aus hygienischer und therapeutischer Sicht eine schnelle Differenzierung zwischen MTK und MOTT nötig.



**Abbildung 5: Speziesspezifische Häufigkeit von Mykobakterien in zu untersuchenden Patientenmaterialien am Universitätsklinikum Rostock**

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der verschiedenen Mykobakterien in Patientenmaterialien, die zur Untersuchung an das Institut für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene Rostock geschickt wurden.

Dabei wurden 64 Patienten berücksichtigt. Das Ergebnis repräsentiert nur die klinischen Isolate einer kleinen Patientengruppe und unterscheidet sich deshalb von dem globalen Vorkommen der genannten Erreger in klinischen Materialien.

Quelle: eigene Erhebung 2007/2008

Abbildung 5 stellt die prozentuale Verteilung der nachgewiesenen Erreger von mykobakteriellen Erkrankungen am Universitätsklinikum Rostock dar, repräsentiert damit jedoch nur ein ausgesprochen kleines Kollektiv und unterstreicht in diesem

die Häufigkeit von atypischen Mykobakterien-Infekten. Im klinischen Alltag jedoch spielen sie eine eher untergeordnete Rolle.

Humanpathogene Mykobakterien können unterschiedlichste Krankheitsbilder verursachen, z. B. chronische Lungenentzündungen, Infektionen von Haut, Weichteilen, Knochen, Gelenken, lokale Lymphadenitis, und generalisierte Erkrankungen. Dabei reicht das Spektrum von klinisch milder Symptomatik bis hin zu manifester Sepsis und betrifft insb. geriatrische Patienten, Immunsupprimierte und Kinder, bei denen milde oder atypische Verläufe und eine unspezifische B-Symptomatik über das wahre Ausmaß der Infektion hinwegtäuschen können.

Bei MTK-Infektionen ist die Einteilung in Primär- und Sekundärinfektion wichtig, wobei letztere wesentlich häufiger vorkommt. Die primäre Erkrankung durch Tröpfcheninfektion beschränkt sich fast immer auf das Lungengewebe, während es bei der Sekundärinfektion häufig zur Streuung des Erregers in andere Organsysteme kommt. Bevorzugter Zielort ist neben der Lunge das Urogenitalsystem. Seltener sind Haut und Weichteile, Lymphgewebe, der Gastrointestinaltrakt, Knochen und das Zentrale Nervensystem betroffen. Weiterhin ist mit komplizierten Verläufen wie Sepsis, Miliartuberkulose und tuberkulöser Meningitis zu rechnen.

Da es sich fast immer um eine Reaktivierung von Mykobakterien z. B. aus Granulomen asymptomatischer Primärinfekte handelt, sind auch bei extrapulmonalen Erkrankungen die Untersuchung von Sputum und die Röntgen-Thorax-Aufnahme zur Lokalisation von pulmonalen Primärherden indiziert. Die chronische Tuberkulose stellt hohe Anforderungen an Diagnostik und Therapie.

#### DIAGNOSTISCHE METHODEN

Aufgrund des Mykolsäuregehaltes der Zellwand von Mykobakterien haben sich verschiedene Färbetechniken etabliert. Die Eigenschaften der Zellwand erlauben dabei eine feste Bindung von Karbolfuchsin und Karbolauramin, wobei eine Entfärbung durch säurehaltige Präparate nach Anfärbung nicht mehr möglich ist. Zu den wichtigsten auf diesem Phänomen beruhenden Methoden gehören:

- Auramin-Fluorochrom-Färbung
- Kinyoun-Färbung
- Ziehl-Neelsen-Färbung

Konventionelle mikroskopische Verfahren sind schnell und technisch mit relativ geringem Aufwand durchführbar, mit einer Sensitivität von 3–94 % [19] jedoch nur wenig empfindlich. Da Mykolsäuren auch in der Zellwand von Vertretern der Spezies *Corynebacterium*, *Nocardia* und *Rhodococcus* enthalten sind, kann zudem nur eine Aussage über das Vorliegen von „säurefesten Stäbchen“, nicht jedoch über einzelne Spezies getroffen werden. Direktpräparate haben eine Nachweisgrenze von ca.  $10^5$  Keimen pro ml; bei durch Zentrifugation konzentrierten Proben kann die Nachweisgrenze auf ca.  $10^4$  Bakterien pro ml angehoben werden [20].

Für den Nachweis von Mykobakterien stellt die Kultur noch immer den Goldstandard dar. Als Kulturmedium eignen sich besonders der Löwenstein-Jensen-Agar (mit Glycerin und PACT), das Middlebrook 7H10-Medium und das Stonebrink-Medium. Als Flüssigkultur werden MP-Flaschen von BacT ALERT (bioMérieux) benutzt. Die bis zu 56-tägige Bebrütung findet bei 37 °C statt.

In der serologischen Untersuchung von Wirtsreaktion auf die Anwesenheit der Erreger haben sich zwei verschiedene Methoden bewährt: der indirekte Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) und der QuantiFeron-TB-Gold-in-Tube-Test zur Untersuchung der Immunantwort über das T-Zellgedächtnis. Bei aktiver und latenter Tuberkulose dient letzterer dem Nachweis des Zytokins Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ); allerdings werden auch T-Zellreaktionen auf *M. kansasii*, *M. szulgai* und *M. marinum* erfasst und damit zusätzliche Differenzierungsverfahren nötig.

Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken (NAT) basieren auf dem Nachweis von DNA und RNA und stellen damit eine besonders sensitive Methode dar. Zu den wichtigsten Verfahren gehört dabei die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR), auf die in 1.5 eingegangen wird. Der direkte Erregernachweis über die DNA hat für die Tuberkulosedagnostik einen enorm großen Stellenwert erreicht, schon 1992 lag die Grenze bei ca.  $10^2$ – $10^3$  Bakterien pro ml eingesetzten Materials [20].

Zur definitiven Diagnose von *M. tuberculosis* führt:

- der mikroskopische Nachweis säurefester Stäbchen
- die Kolonienmorphologie auf Festnährmedien
- der positive Nukleinsäuretest (MTK-Bakterien)
- der Nachweis von Nikotinsäure (Niacintest) im angezüchteten Bakterium
- der Nachweis von Nitratreduktase (Nitrattest) im angezüchteten Bakterium

### 1.4.2 Chlamydien

#### MIKROBIOLOGISCHE CHARAKTERISTIKA UND EPIDEMIOLOGIE

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Bakterien und zur In-vitro-Vermehrung auf eukaryote Zellen angewiesen. Außerhalb von Wirtszellen existieren sie als infektiöse Elementarkörperchen (EK) von ca. 0,3 µm Durchmesser und können in dieser Art von Ruhezustand auch Antibiotikatherapien überleben. Wichtig für die Zelladhäsion an einer Wirtszelle ist das 40 kDa große Major-outer-membranic-Protein A (*ompA*), welches aus fünf konstanten und vier variablen Untereinheiten besteht. Chlamydien werden phagozytotisch über die Mikrovilli der Wirtszelle aufgenommen. In der Zielzelle wandeln sie sich in Retikularkörperchen (RK, ø 1 µm) mit aktivem Metabolismus um und nutzen dabei den Stoffwechsel und die Energiereserven der Wirtszelle [21].

Zur Familie der *Chlamydiaceae* gehören an humanpathogenen Arten *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydophila psittaci*. *C. trachomatis* ist ein häufiger Erreger von kongenitalen Konjunktividen und Infektionen im Urogenitaltrakt bei der sexuell aktiven Bevölkerung. Er kann jedoch auch Pneumonien bei Neugeborenen verursachen [22].

*C. psittaci* befällt hauptsächlich die Lunge von Vögeln und verursacht die Ornithose. Neben Haustieren können sich jedoch auch Menschen mit diesem Erreger infizieren, prädestiniert sind Vogelzüchter und Tierpfleger sowie Angestellte in Massenzuchtbetrieben. Aus epidemiologischen Gründen ist die Differenzierung zu *C. pneumoniae* wichtig. Der Krankheitsverlauf von Psittakosen ist meist schwerer als bei *C.-pneumoniae*-Pneumonien und häufiger letal.



*C. pneumoniae* sind für 10–30 % der CAP verantwortlich [23]. Die Durchseuchung der Bevölkerung beträgt nach dem dritten Lebensjahrzehnt bereits 60 % [24]. Als Erregerreservoir dient ausschließlich der Mensch, die Bedeutung tierischer Biovare ist nicht hinreichend geklärt.

*C. pneumoniae* wird aerogen übertragen und verursacht mit einer Inkubationszeit von 5–15 Tagen Pneumonien, Bronchitiden und Pharyngitiden mit auffälliger Heiserkeit und Husten. Die Klinik unterscheidet sich dabei kaum von anderen Pneumonieerregern [25]. Zu den erregerassoziierten Erscheinungsbildern gehören neben der Pneumonie postinfektiöse Arthritiden und Tendinitiden, aber möglicherweise auch das Guillain-Barré-Syndrom, Arteriosklerose, Sarkoidose, Myokarditis und Meningoenzephalitis, Arthritis, Endokarditis, Meningoradikulitis und Erythema nodosum [20, 24, 26, 27].

#### DIAGNOSTISCHE METHODEN

Die kulturelle Anzucht ist äußerst kompliziert, gering sensitiv und Speziallaboratorien vorbehalten. Da es für den Nachweis von *C. pneumoniae* bisher keinen Goldstandard gibt, ist die genaue Aussage über die Prävalenz von Infektionen schwierig [5].

Zur Diagnostik werden bislang serologische Methoden am häufigsten eingesetzt. Aufgrund unzureichender Validierung wird die Komplementbindungsreaktion (KBR) nicht empfohlen [28]. Besser geeignet sind Mikro-Immuno-Fluoreszenz- (MIF) und ELISA-Verfahren, weil dort speziesspezifisch differenziert werden kann. *C. pneumoniae* spezifische ELISA-Tests weisen IgG- oder IgA-Antikörper nach. Dazu dienen mit Antigen beschichtete Mikrotiterplatten, denen erst Serum, dann Peroxidase mit gekoppelten Antihuman-IgG- oder -IgA-Antikörpern zugesetzt wird. Nach der Inkubation mit dem Substrat Tetramethylbenzidin und dem Abstoppen der Farbreaktion mit Schwefelsäure erfolgt die photometrische Messung. Die Absorption ist dabei proportional zum Gehalt an Antikörpern.

Ein Anstieg an IgM ist meist erst zwei bis drei Wochen nach Beginn der Infektion zu verzeichnen und hält bis max. zwei bis sechs Monate lang an. Hohe IgM-Konzentrationen deuten auf eine akute Infektion hin, jedoch ist die Bewertung stets vom klinischen Bild und vom Titerverlauf abhängig.



Im IgG-Titer liegt das Maximum bei sechs bis acht Wochen nach Infektionsbeginn, bei einer Reinfektion deutlich früher bei einer bis zwei Wochen, in denen aber kein IgM-Anstieg zu verzeichnen ist [29]. Wegen der Persistenz von erregerspezifischem IgG können diese Antikörper auch bei gesunden Erwachsenen vorliegen.

Der IgA-Nachweis stützt insb. die Diagnostik der Reinfektion und wird deshalb oft zusätzlich zu den Nachweisen der anderen Antikörper durchgeführt. Hochwahrscheinlich ist eine akute Infektion bei einem IgM-Titer > 1:16 oder einem vierfachen Titeranstieg von IgG [30].

Nachteilig bei den serologischen Verfahren sind der apparative Aufwand, das Fehlen einer Standardisierung, die gegebenenfalls subjektive Interpretation und die häufige Notwendigkeit einer zweiten Untersuchung.

Die Nachweisrate von Chlamydien steigt durch hochsensitive Amplifikationsverfahren (NAT). Eine nachweisbare unspezifische Besiedelung des Respirationstrakts durch *C. pneumoniae* ist scheinbar auch ohne Krankheit möglich und führt bei der Interpretation von hochsensitiven NATs zu neuen Problemen [5].

### 1.4.3 Mykoplasmen

#### MIKROBIOLOGISCHE CHARAKTERISTIKA UND EPIDEMIOLOGIE

Mit einem Durchmesser von 0,3–0,8 µm und einem Genom von ca. 0,9 Megabasen gehören Mykoplasmen zu den morphologisch und auch genomisch kleinsten Bakterien überhaupt. Die Hauptform ist kokkoid, jedoch können sich die aufgrund der fehlenden Zellwand polymorphen Zellen auch scheibenförmig, ringförmig oder fadenförmig darstellen. Ein hoher Cholesteringehalt der Membran zeichnet sie aus. Mykoplasmen gehören zur Klasse der *Mollicutes* (*molle* = weich, *cutis* = die Haut) und wurden wegen ihrer fadenförmigen Struktur ursprünglich als Pilze betrachtet. Besonders in Zellkulturabteilungen wissenschaftlicher Routinelaboratorien sind Kontaminationen mit *M. orale*, *M. arginini* oder *M. hyorhinae* in ernstes Problem. Die mit ihrer geringen Größe und Verformbarkeit durch 0,2 µm große Poren passenden Bakterien gelangen oft schon während der Aufreinigung ungehindert ins Probematerial.

*M. pneumoniae* besitzt als wichtigen Virulenzfaktor für die Anheftung an respiratorische Epithelien das 168 kDa Protein *Adhäsion P1*. Dieses Protein kommt

ohne bekannte genetische Variationen bei allen *M.-pneumoniae*-Stämmen vor und ist damit hochspezifisch [31]. Pathomechanisch unterbrechen die Erreger nach einer Inkubationszeit von ca. zwanzig Tagen die Zilienbewegung und lysieren die Epithelzellen ihres Wirts.

Mykoplasmen sind streng wirtsspezifisch und werden aerogen oder durch Schmierinfektion übertragen [32]. Über die physiologische Besiedlung des Respirationstrakts finden sich in der Literatur widersprüchliche Meinungen [31].

Als obligate Parasiten sind Mykoplasmen auf die Besiedlung von Schleimhäuten angewiesen und werden für 5–15 % der CAP verantwortlich gemacht [33, 34]. Epidemiologisch findet sich ein Häufigkeitsgipfel bei Kindern und Jugendlichen (5–25 Jahre), 80 % der Erkrankten sind jünger als 40 Jahre [12]. Die Durchseuchungsrate beim Erwachsenen ist hoch und kann die Diagnostik erheblich erschweren [35].

Die Infektion äußert sich durch eine interstitielle Pneumonie mit Beteiligung von Monozyten, polymorphkernigen Leukozyten und Epithelzellen. Zu den Erkrankungsformen gehören neben der primären atypischen Pneumonie und anderen Infekten des oberen Respirationstraktes mit Befall von Bronchien, Bronchioli, Pharynx und Trachea auch Pleuritiden, Otitiden und Myringitiden. Zu den assoziierten Erkrankungen gehören Entzündungen im kardialen, dermatologischen, hämatologischen und neurologischen Bereich [20].

#### DIAGNOSTISCHE METHODEN

Die kulturelle Anzucht des Bakteriums ist Speziallaboratorien vorbehalten und nimmt auf Medien wie PPLO-Nährmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> zwei bis fünf Wochen in Anspruch.

Morphologisch erscheinen die Kolonien in einer typischen Spiegeleiform von 10–600 µm Durchmesser. Erst ab einer Erregermenge > 10<sup>5</sup> CFU/ml ist der Nachweis möglich. Mit ca. 61 % ist die Sensitivität der Kultur im Vergleich zur PCR gering [36].

Zu den am häufigsten eingesetzten Methoden für den Nachweis von *M. pneumoniae* gehört die Serologie. Komplementbindungsreaktionen werden als unzureichend betrachtet [37, 38]. Dagegen haben sich ELISA-Systeme zur Testung

von IgG, IgM und IgA gut etabliert. Dabei müssen die Ergebnisse vor dem Hintergrund einer hohen Prävalenz von spezifischen IgG-Antikörpern bei Erwachsenen und dem Mangel an IgM in einigen primären oder sekundären Fällen von Infektionen betrachtet werden. Kinder sind oft nur bei der Erstinfektion IgM-positiv; ein Titer unterhalb der Erfassungsgrenze schließt jedoch eine Infektion nicht aus. Folglich ist die Testung von IgA sinnvoll. Eine Einzeltitermessung > 1:10 oder ein deutlicher Titeranstieg weisen auf eine Infektion hin, jedoch kann es insb. bei Pankreatitiden, Karditiden und Meningitiden zu falsch-positiven Ergebnissen kommen [39].

In den letzten Jahren haben sich auch hier PCR-Verfahren erfolgreich etabliert [40-44].

#### 1.4.4 Legionellen

##### MIKROBIOLOGISCHE CHARAKTERISTIKA UND EPIDEMIOLOGIE

Die Erreger sind obligat aerobe, Gram-negative Stäbchen mit meist monopolarer Geißel. Legionellen können intrazellulär überleben und vermehren sich in Alveolarmakrophagen von Eukaryonten und Amöben. Eine Therapie sollte daher eine intrazelluläre Penetration erlauben. Als wichtigen Virulenzfaktor besitzen sie das 24 kDa Macrophage-Infectivity-Potentiator-Protein (*mip*).

Zur Familie der *Legionellaceae* gehören 42 Spezies und 62 Serogruppen [45]. Reservoir der hydrophilen Erreger sind (Warm-) Wasserleitungssysteme (25–42 °C) wie Duschen, Klimaanlage, Kühlsysteme, Leitungen u. Ä.

Legionellen-Infektionen sind zumeist nosokomialer Genese, kommen mit 2–9 % der CAP aber auch ambulant häufig vor [46, 47]. Problematisch werden die Infektionen durch eine hohe Letalität von 5 bis 30 % [48, 49]. Dabei ist *L. pneumophila* Serogruppe 1 für ca. 72 % der Legionellosen verantwortlich [48, 50]. Es gibt jedoch einige Non-*L. pneumophila*-Stämme wie *L. micdadei*, *L. dumoffi* und *L. bozemanii* [49, 51-54], die humanpathogen sind und potenziell letale Infekte verursachen können [55, 56]. Dies betrifft auch nosokomiale Sepsen bei immunsupprimierten Patienten [57]. Glukokortikoid-Therapien, COPD, Bronchiektasen, Transplantationen und Mukoviszidose begünstigen neben *Staphylococcus aureus* und

*Pseudomonas aeruginosa* auch das Wachstum von Legionellen [58-61]. Bei der Anamnese sollte die Reiseaktivität berücksichtigt werden, da die Wasserleitungssysteme südeuropäischer Länder eine deutlich höhere Besiedlung aufweisen.

Infektionen treten oft epidemisch in Krankenhäusern, Kinderheimen, Pflegeeinrichtungen, Sportstätten u. Ä. auf [62]. Dabei beträgt die Inkubationszeit zwei bis zehn Tage.

Legionellose betreffen in Form von interstitiellen Pneumonien vorrangig die Lunge. Selten treten das Pontiac-Fieber mit kurzer Inkubationszeit, grippeähnlicher Symptomatik ohne Lungenbeteiligung oder extrapulmonale Manifestationen mit Beteiligung von Zentralem Nervensystem, Leber, Nieren und anderen Organsystemen und können dann z.B. als Endokarditis, Pyelonephritis oder Wundinfekt manifestieren. Die Möglichkeit einer oropharyngealer Kolonisation durch Legionellen wird diskutiert [63].

Die pulmonale Legionellose äußert sich mit unspezifischen, grippeähnlichen Beschwerden wie Schüttelfrost, hohem Fieber, Myalgien, trockenem Husten, Diarrhoe und evtl. Enzephalitis-ähnlicher Symptomatik.

Prädisponiert sind Immuninkompetente oder -geschwächte, Tumorerkrankte, chronisch Lungengeschädigte und Alkoholiker. Häufiger als andere Pneumonieerreger können Legionellen zu Fibrosen der Lunge führen. Die Rückbildung des radiologischen Nachweises kann bis zu 6–12 Monate betragen und betrifft bis zu 25 % der Patienten [64]. Extrapulmonale Manifestationen sind sehr selten und vorrangig bei immunsupprimierten Patienten anzutreffen. Dabei wurden unter anderem Sinusitis, Peritonitis, Pankreatitis, Pyelonephritis, Myokarditis, Pericarditis, septische Arthritis und perirektale Abzessbildung beschrieben [65, 66]. Eine Verzögerung der Antibiose führt zu einem schlechteren Outcome, laut aktueller Studien ist eine Letalität von bis zu 33 % anzunehmen [67, 68]. Eine frühzeitige Therapie kann die Letalität von *L. pneumophila*-Infektionen bei immunkompetenten Personen jedoch auf <5 % senken [69, 70]. Neben *L. pneumophila* Serogruppe 1 gibt es weitere humanpathogene Legionellen, die für letale Verläufe verantwortlich sein können.

Die wichtigsten sind:

- *L. pneumophila* mit 14 Serovaren incl. Serogruppe 1, 4, 6
- *L. bozemanii*
- *L. dumoffii*
- *L. micdadei*

Humane Infektionen wurden außerdem beschrieben bei:

- |                                  |                                |
|----------------------------------|--------------------------------|
| • <i>L. anisa</i> [71]           | • <i>L. lansingensis</i> [78]  |
| • <i>L. birminghamensis</i> [72] | • <i>L. longbeachae</i> [79]   |
| • <i>L. cinncinatiensis</i> [73] | • <i>L. maceachernii</i> [80]  |
| • <i>L. feeleeii</i> [74]        | • <i>L. oakridgensis</i> [81]  |
| • <i>L. gormanii</i> [75]        | • <i>L. sainthelensis</i> [82] |
| • <i>L. hackeliae</i> [76]       | • <i>L. tucsonensis</i> [83]   |
| • <i>L. jordanis</i> [77]        | • <i>L. wadsworthii</i> [84]   |

Bei hinreichender Immunsuppression des betroffenen Patienten ist anzunehmen, dass jede Legionellen-Spezies eine entsprechende Erkrankung auslösen kann.

#### DIAGNOSTISCHE METHODEN

*Legionella*-Infektionen werden in der Routinediagnostik durch Kultur, Serologie oder direkte Immunofluoreszenz (DIF) nachgewiesen. Es gibt bisher kein Verfahren, dass den Goldstandard darstellt.

Originalpräparate lassen sich mittels Gram-Färbung und 0,1%iger Fuchsinlösung anfärben und zeigen unspezifisch Gram-negative, kokkoide oder plumpe,  $0,5 \times 1\text{--}2\text{ }\mu\text{m}$  große Stäbchen. Der spezifische Legionellen-Nachweis gelingt mikroskopisch erst durch die direkte Immunofluoreszenz.

Die Kultur von Legionellen auf BCYE- oder GVPC-Agar bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank beansprucht drei bis zehn Tage. Die Sensitivität ist sehr variabel und liegt bei 10–80 % und ist mit 100 % jedoch hochspezifisch [47, 85].

Der Nachweis von IgG-, IgM- und IgA-Antikörpern ist ebenfalls durch direkte Immunofluoreszenz möglich; hinweisend ist ein vierfach erhöhter Titer im Abstand von 10–14 Tagen. Der Antikörpernachweis gelingt frühestens nach zehn Tagen, ein

Beleg der Erkrankung ist somit erst ca. vier bis sechs Wochen nach Erkrankungsbeginn möglich [86, 87]. IgM-Antikörper können mehr als zwei Jahre lang persistieren [88]. Beschrieben wurden auch kulturell nachgewiesene Infektionen bei Abwesenheit von Serokonversion. Mit einer Sensitivität von 25–75 % [87, 89, 90] und einer hohen Wahrscheinlichkeit von Kreuzreaktionen mit anderen bakteriellen Erregern wird das Verfahren aktuell von dem deutschen CAPNET und anderen Autoren nicht mehr empfohlen [47, 91, 92].

Der Urin-Antigentest ist rasch durchzuführen. ELISA-Verfahren mit Urinproben bei *L.-pneumophila*-Infektionen haben sich dabei als sensitiver und spezifischer als immunochromatografische Tests (ICT-) erwiesen [93, 94].

Die Anwendung von Urin-Antigentests liefert jedoch nur eine Aussage über die Anwesenheit von *L. pneumophila* der Serogruppe 1, während andere Serovare und Spezies nicht oder nur mit deutlich geringer Sensitivität detektiert werden. Verschiedene groß angelegte Studien haben für den Urin-Antigen-Nachweis Sensitivitäten von ca. 37 % bis maximal 93 % und Spezifitäten zwischen 96–100 % aufzeigen können [85, 93-96]. Die Detektion von nosokomial erworbenen Legionellen schnitt sich dabei am schlechtesten ab, während reisebedingte Erkrankungen durchschnittlich am besten detektierbar waren [85]. Die Sensitivität lässt sich durch Ultrafiltration des Urins steigern [93, 97, 98].

Nach neueren Erkenntnissen sind Urin-Schnelltests nicht mehr empfehlenswert [99, 100], werden jedoch in vielen Kliniken praktiziert.

## 1.5 Die PCR zur Diagnostik erregerspezifischer Nukleinsäuren

Anfang der 90er Jahre wurden die ersten PCR-Techniken zum direkten Nachweis erregerspezifischer DNA entwickelt, die seither die mikrobiologische Diagnostik revolutioniert haben.

### 1.5.1 Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zuerst von Kary Mullis 1985 beschrieben [101, 102]. Sie ist ein hochoempfindliches In-vitro-Verfahren zur selektiven

Vervielfältigung definierter DNA- oder RNA-Abschnitte. Der repetitive Durchlauf in 20–40 Zyklen führt zur exponentiellen Amplifikation der DNA.

Dabei gliedert sich der Arbeitsablauf in drei thermische Schritte:

1. Im Denaturierungsschritt wird doppelsträngige DNA bei ca. 95 °C erhitzt und durch die Zerstörung von Wasserstoffbrückenbindungen in Einzelstränge getrennt (thermische Hydrolyse).
2. Beim Annealing wird die Temperatur auf 40–72 °C gesenkt, um ein Anlagern von 17 bis 30-meren spezifischen Oligonukleotiden (der Primer) an komplementäre Sequenzregionen der Matrix-DNA zu ermöglichen. Die Wahl einer geeigneten Temperatur für diesen Schritt hängt dabei entscheidend vom thermodynamischen Schmelzpunkt ( $T_m$ -Wert) der Primer ab.
3. Die Extension oder Elongation bei 68–72 °C als letzter Schritt ist die Synthese eines komplementären Einzelstrangs. Dabei findet eine Polymerisation der dNTPs durch eine temperaturstabile Taq-DNA-Polymerase entlang der DNA-Matrize statt. Wichtige Einflussfaktoren sind die Prozessivität dieser Taq-Polymerasen und die Länge des Amplikons [102, 103].

Das Ziel der erregerspezifischen PCR-Diagnostik ist der Nachweis von hochspezifischen Genregionen (z. B. die Sequenzen von Virulenzfaktoren oder ribosomaler DNA) und somit der Nachweis spezifischer DNA einer bestimmten mikrobiellen Familie, Gattung oder Spezies in dem zu untersuchenden Material. Die Sensitivität von PCR-Verfahren liegt bei ca. 90–100 % bei einer Spezifität von meist ca. 100 % [5].

#### NESTED-PCR

Eine besondere Form der PCR ist die Nested-Technik. Diese äußerst empfindliche Art der PCR wird bevorzugt zur Diagnostik von Liquor und Knochengewebe eingesetzt. Dabei werden zwei PCRs nacheinander durchgeführt und zwei verschiedene Primerpaare verwendet. Das Produkt des ersten Schritts ist ein größeres Amplikon, das des zweiten Schritts ein innerhalb dieser Sequenz gelegenes kleineres Amplikon.

Die Nested-PCR ist sensitiver und spezifischer als herkömmliche PCR-Methoden, da erstens zweimal nacheinander amplifiziert wird und zweitens durch unspezifische Primerbindungen entstandene Amplikons im zweiten Schritt nicht weiter amplifiziert werden. Wird das Reaktionsgefäß für die zweite Amplifikation jedoch erneut geöffnet, besteht ein erhöhtes Kontaminationsrisiko.

#### NACHWEIS VON AMPLIFIKATEN

Produkte der Nukleinsäureamplifikation können entweder nach Ablauf der PCR oder simultan zur Entstehung mittels Real-Time-Verfahren nachgewiesen werden.

Zu den wichtigsten Techniken im Anschluss an den PCR-Durchlauf gehören die Gelelektrophorese (2.5.1, S. 45 und Abbildung 11, S. 49) und DNA-Enzyme-immuno-Assay-Hybridisierungsverfahren (DEIA). Bei der DEIA hybridisiert eine spezifische Sonde innerhalb des Amplikons und es kommt zur photometrisch detektierbaren Farbentwicklung. Die 5'-biotinylierten sequenzspezifischen Oligonukleotid-Sonden (SSO) sind dabei an eine mit Streptavidin beschichtete Platte gebunden und hybridisieren mit den denaturierten DNA-Einzelsträngen des Amplikons. Das Sonden-Amplikon-Hybrid wird von einem spezifischen Antikörper erkannt, welcher über Protein A auch eine Peroxidase gebunden hat. Nach erfolgreicher Bindung kann letztere ein chromogenes Substrat zu einem löslichen farbigen Agens umsetzen und damit eine photometrische Detektion ermöglichen.

#### **1.5.2 Real-Time-PCR**

Eine Real-Time-PCR (RT-PCR) unterscheidet sich grundsätzlich von einfachen PCRs durch die quantitative Erfassung der entstandenen Amplikon-Menge noch während des PCR-Prozesses. Dies wird realisiert durch die Verwendung geeigneter (z. T. Sonden-gebundener) Fluoreszenzfarbstoffe und eines optischen Detektionssystems mit entsprechender Software, welche die Auswertung der während der Amplifikation gewonnenen Messergebnisse ermöglicht.

Neben dem Vorteil der Quantifizierbarkeit zeichnen sich RT-PCR-Verfahren durch eine sehr rasche Durchführbarkeit aus. Da die Reaktionsgefäße zum Auftragen auf Elektrophoresegele nicht mehr geöffnet werden, ist das Kontaminationsrisiko



zudem deutlich geringer. Dies wiederum verbessert die Spezifität des Real-Time-Verfahrens.

#### SYBR-GREEN I

SYBR-Green I<sup>1</sup> ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der unspezifisch zum Nachweis doppelsträngiger DNA verwendet wird. Er wird vor allem eingesetzt, um erprobte einfache PCRs rasch in ein RT-PCR-Verfahren zur gezielten quantitativen Detektion von Erregern umzusetzen, wobei die Unterscheidung von Amplifikaten und Primerdimeren durch eine Schmelzkurvenanalyse erfolgt (vgl. 3.1.1).

#### TAQMAN-SONDEN

TaqMan-Sonden können zum spezifischen Nachweis definierter Gensequenzen eingesetzt werden. Eine komplementär zum gesuchten Genort konzipierte DNA-Sonde besitzt am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff (R), am 3'-Ende einen Phosphatrest sowie einen Fluoreszenz-unterdrückenden Farbstoff, den Quencher (Q). Dieser blockiert durch seine räumliche Nähe zum Reporterfarbstoff selbst bei optimaler Anregung dessen Fluoreszenzsignal (Fluoreszenz-Energietransfer-Effekt; FET-Effekt), solange die Sonde intakt ist. Kann die Sonde im Verlauf der PCR jedoch an die Erreger-DNA-Matrize hybridisieren, führt das Zusammentreffen mit einer thermostabilen Taq-DNA-Polymerase während der Extension zur Ausbildung einer räumlichen Sekundärstruktur. Dies aktiviert das Enzym und es kommt zur Hydrolyse.

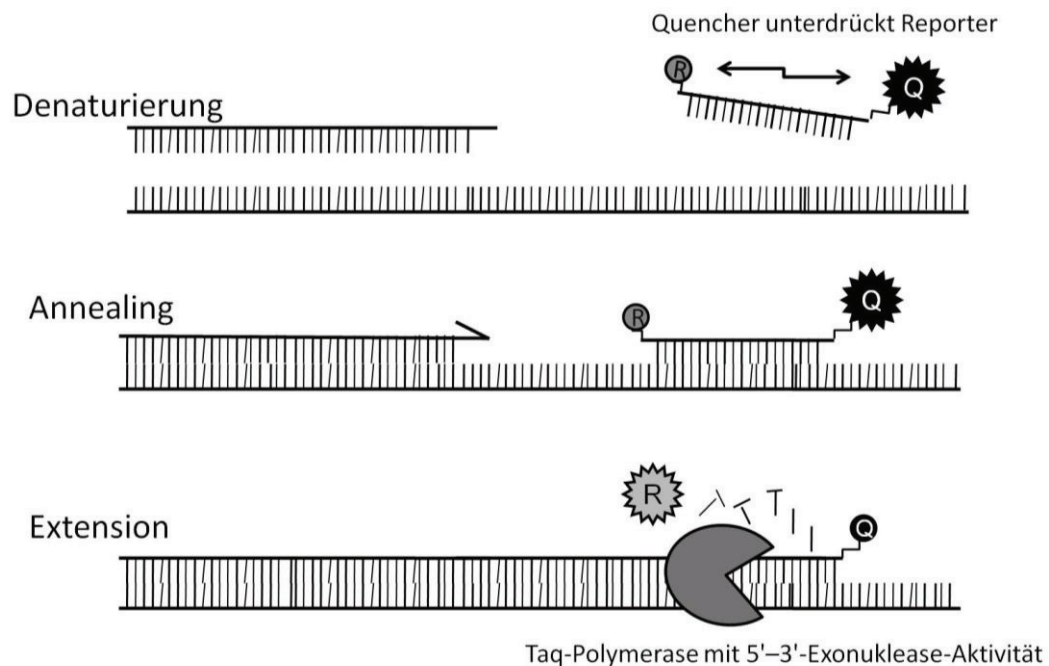
Das Verfahren nutzt die 5'–3'-Exonuklease-Eigenschaft der thermostabilen DNA-Taq-Polymerase aus. Der Reporterfarbstoff wird durch die Lyse der Sonde räumlich vom unterdrückenden Quencher getrennt, der FET-Effekt aufgehoben und der Reporterfarbstoff fluoresziert (Abbildung 6). Eine ungenügende Anlagerung der Sonde an die DNA (z. B. durch Inhibitoren) bzw. Abweichungen in der Sequenz führen nicht bzw. nur unzureichend zum Signal.

Mit jedem Zyklus und damit dem Anstieg an Amplifikaten und potentiellen Hybridisierungsorten für die Sonde steigt über bis zu 8 Zehnerpotenzen linear auch

---

<sup>1</sup> 2-[N-(3-dimethylaminopropyl)-N-propylamino]-4-[2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene]-1-phenyl-quinolinium

die Intensität der Fluoreszenz, das Fluoreszenzsignal verhält sich linear zur Amplikonmenge [104].



**Abbildung 6: FET-Effekt bei TaqMan-Sonden**

*Quelle: eigene Darstellung auf Basis von Thiemann et al., 2006 [103]*

#### MOLECULAR-BEACON-SONDEN UND SCORPION-PRIMER

Andere RT-PCR-Systeme verwenden Molecular-Beacon-Sonden oder Scorpion-Primer. Die Molecular-Beacon-Sonden stellen eine weiterentwickelte Form der TaqMan-Sonden dar. Sie bilden eine dreidimensionale Haarnadelstruktur aus, bei der Fluoreszenzfarbstoff und Quencher unmittelbar benachbart liegen. Dieser Zustand minimiert die unvollständige Fluoreszenzunterdrückung [103]. Diese TaqMan-Sonden-Variante ist jedoch ungleich teurer und war für die Versuche dieser Arbeit nicht erforderlich.

Scorpion-Primern ist am 5'-Ende eine Nukleinsäure-Sequenz mit Fluoreszenzfarbstoff und Quencher angehängt. Aufgrund ihrer räumlichen Haarnadelstruktur wird diese während der Amplifikation jedoch nicht komplementär ergänzt. Erst im Verlauf der Elongation entsteht eine Strangkopie, die an die Verlängerung hybridisiert und diese aktiviert, indem der

Fluoreszenzfarbstoff und Quencher voneinander getrennt werden. Auch dieses Verfahren ist sehr aufwendig und teuer [105] und wurde hier nicht verwendet.

## 1.6 Qualitätskontrolle durch $\beta$ -Globin

Zur Gewährleistung eines hohen Qualitätsstandards ist die Mitführung von Kontrollmaterial im Sensitivitäts-Grenzbereich des Nachweisverfahrens erforderlich. Bei Nukleinsäure-Amplifikations-Tests (NATs) dienen dabei „Mastermix“-Proben als Negativkontrolle, mit Erregernukleinsäure versetzte Proben als Positivkontrolle und Proben aus den Aufreinigungsschritten zum Nachweis eventuell vorhandener Inhibitoren.

Der Beleg für die erfolgreiche Extraktion von DNA und Freiheit von Nukleasen wird somit über eine externe Inhibitionskontrolle durch den Nachweis des  $\beta$ -Globin-Gens als Zielgen erreicht. Das  $\beta$ -Globin-Gen liegt auf dem kurzen Arm des humanen Chromosoms 11 und kodiert für die  $\beta$ -Kette des Hämoglobins, welches sich aus je zwei sauerstoffbindenden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten zusammensetzt.

Da die Zielsequenz für  $\beta$ -Globin in zwei Kopien in allen Körperzellen des Menschen vorliegt, ist dieser Nachweis sensitiv. Außerdem lässt sich die Zahl der eingesetzten Zellen berechnen und der Nachweis wird damit quantifizierbar. Das humane  $\beta$ -Globin unterscheidet sich deutlich von dem anderer Spezies. Fast jede Art von menschlichem Probenmaterial enthält humane Zellen in hohen Mengen und damit  $\beta$ -Globin-kodierende DNA; eine Ausnahme stellen zellarme Materialien wie der Liquor gesunder Menschen dar.

## 1.7 Problemstellung und Zielsetzung

### 1.7.1 Kombiniertes Nachweis

Die beschriebene Problematik beim Nachweis der beschriebenen atypischen Pneumonieerreger und Tuberkulosebakterien war der Anlass für die Entwicklung eines kombinierten, vereinheitlichten Detektionssystems für MTK-Bakterien und die wichtigsten atypischen respiratorischen Erregern *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* und *Legionella* spp. inkl. *L. pneumophila*. Das Verfahren beinhaltet außerdem eine

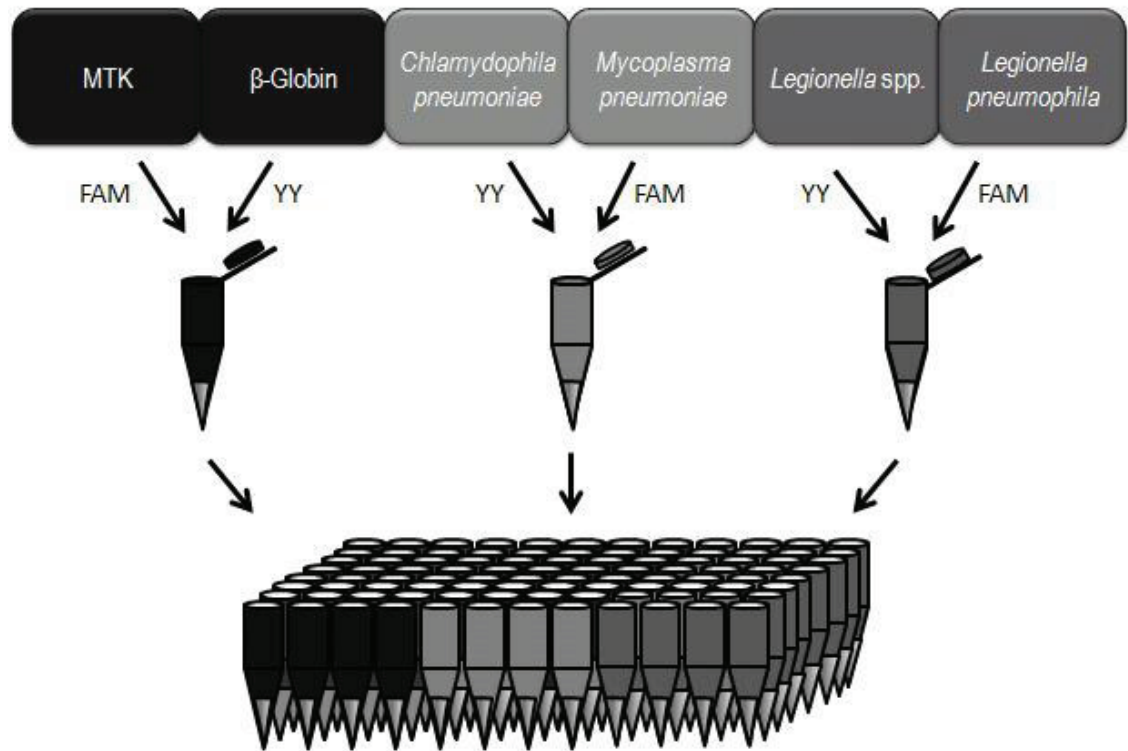
Inhibitionskontrolle durch den Nachweis des humanen  $\beta$ -Globins. Die Zusammenlegung der Erregernachweise war aus folgenden Gründen sinnvoll:

1. Es sind Erreger mit denselben Zielstrukturen (Respirationstrakt).
2. Sie spielen eine große Rolle bei nosokomialen Infektionen und Epidemien.
3. Die Diagnostik hat weitreichende Konsequenzen für die Therapie und die Einleitung hygienischer Maßnahmen.
4. Die ätiologische Differenzierung ist von klinischer und labortechnischer Seite her schwierig.
5. Sie gehören zu den häufigsten für eine mikrobiologische Diagnostik angeforderten Erregern.
6. Die Nachweisanforderung beinhaltet oft alle drei atypischen Erreger.
7. Durch die Zellwandbeschaffenheit oder den Metabolismus der Erreger ist der Nachweis mit herkömmlichen Methoden sehr aufwändig, Speziallaboratorien vorbehalten oder wegen langer Replikationszeiten nicht zeitgerecht möglich.
8. Sofern die Erreger mittels kulturgebundener Methoden nachgewiesen werden, ist dies wegen der Spezialnährböden oder des Sicherheitsstandards sehr aufwendig, gehört nicht in die Routine eines diagnostischen Standardlabors oder ist wegen langer Replikationszeiten nicht zeitgerecht möglich.
9. PCR-Methoden für diese Erreger wurden in den letzten Jahren erfolgreich in der Diagnostik etabliert und nehmen weiter an Bedeutung zu.
10. Die Detektion von Koinfektionen ist möglich.

### **1.7.2 Aufgabenstellung und Konzept**

Zum langfristigen Ersatz bisheriger routinediagnostischer Nachweise sollte ein schnelles und verhältnismäßig kostengünstiges kombiniertes Verfahren entwickelt und etabliert werden sollte. Die Entwicklung dieses Multiplex-Verfahrens sollte die simultane Detektion der Erreger in einem Ablauf mittels Real-Time-PCR und TaqMan-Sonden unter Integration einer Inhibitionskontrolle über den hochspezifischen und sehr sensitiven Nachweis des humanen  $\beta$ -Globin-Gens ermöglichen.

Die Grundlage dieser RT-PCR stellen dabei gekoppelte Duplex-Systeme – die Kopplung von je zwei Nachweisen in einem Reaktionsgefäß – mit anschließender simultaner Detektion der Nachweispaaire auf einer Platte (Abbildung 7) dar.



**Abbildung 7: Schematische Konzeptübersicht des Multiplex-Analysesystems**

Dargestellt ist eine vereinfachte Zeichnung einer 96-Kavitäten-Platte, wie sie ins Real-Time-Instrument eingebracht und analysiert wird. Schematisch stehen die verschiedenen Graubereiche für den jeweiligen gekoppelten Nachweis mit den beiden Analysefluoreszenzfarbstoffen FAM und Yakima Yellow (YY).

Die Entwicklungsschritte beinhalteten:

1. die Entwicklung, Anwendung und Optimierung der generierten Primer und Sonden in praktischen Experimenten
2. die Angleichung der Amplifikationsbedingungen unter Berücksichtigung der thermodynamischen Schmelzpunkte
3. eine weitgehende Kopplung der Erregernachweise zur Einsparung von Arbeitszeit, Personal und Material ohne Sensitivitätsverlust

4. die Validierung des Systems und die Testung einer Bandbreite anderer respiratorischer Erreger und Patientenproben unter der Berücksichtigung folgender Parameter:

- Sensitivität
- Spezifität
- positiver prädiktiver Wert (PPV)
- negativer prädiktiver Wert (NPV)
- Reproduzierbarkeit
- Linearität
- Richtigkeit
- Präzision
- Matrixeffekt

Es wurden folgende Detektionspaare untersucht:

1. *Mycobacterium tuberculosis* –  $\beta$ -Globin
2. *Chlamydophila pneumoniae* – *Mycoplasma pneumoniae*
3. *Legionella* spp. – *Legionella pneumophila*

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Klinische Proben und Referenzmaterial

#### 2.1.1 Patientenmaterial

Die Patientenproben stammten aus stationären und ambulanten Bereichen des Klinikums der Universität Rostock. Dabei wurden folgende (respiratorische) Materialien von Patienten zur Aufreinigung verwendet:

- Bronchialsekret
- Bronchio-alveoläre Lavage (BAL)
- Nasen- und Rachenabstriche
- Pleurapunktat
- Sputum
- Trachealsekret

Als Material bei Tuberkulose-Verdacht wurden zusätzlich folgende Proben verwendet:

- Punktat (z. B. Aszitis-, Gelenk-, Gewebepunktat)
- Liquor bei Verdacht auf *Meningitis tuberculosa*
- Magensaft (bei Kindern)
- Gewebe in Form von Paraffinblöcken (Lymphknoten, Parotis, Bandscheibe, Colon, Ileum)
- Biopsien (Frischmaterial)
- EDTA-Blut bei Immunsupprimierten mit Verdacht auf Miliar-Tuberkulose
- Menstrualblut, Ejakulat, Prostatasekret
- Urin

Die kulturelle Anzucht von Mykobakterien erfolgte auf Stonebrink-Medium mit PACT, Löwenstein-Jensen-Medium mit Glycerin und PACT bei  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  über 56 Tage. Zur Herstellung von Flüssigkulturen in BacT-ALERT-MP-Kulturflaschen wurde je eine Kolonie vom Festmedium abgenommen, mit 0,5 ml sterilem Aquadest in einem 1,5 ml Eppendorfröhrchen gemischt und bei  $95^\circ\text{C}$  im Heizblock (Stuart Scientific) 20 min erhitzt.

Mangels einer repräsentativen Anzahl positiver Patientenproben für die Positivkontrollen<sup>X</sup> wurden mit Referenz-DNA versetzte negative Patientenproben

verwendet. Zuvor im Standard-PCR-Verfahren mit anschließender DEIA negativ getestete Patientenproben unterschiedlichen humanen DNA-Gehalts wurden dazu mit DNA aus Referenzbakterienstämmen versehen. Von den Gemischen wurden Verdünnungsreihen von 0,1 fg/μl bis 1 ng/μl Gesamt-DNA hergestellt. Die Erreger-DNA stammte aus der unten genannten Kontrollgruppe, so dass das Spektrum neben genomsequenzierten Laborstämmen (ATCC, DSMZ) und rekombinanter Plasmid-DNA auch Wildtypstämmen von Patienten umfasste.

Zum Ausschluss von Kreuzreaktionen wurden je bis zu 80 weitere Spezies von Bakterien und Pilzen getestet (vgl. Tabelle 13, S.72).

### **2.1.2 Rekombinante Plasmide**

Zur Herstellung von rekombinanten Plasmiden wurden große Amplifikate mit der gesuchten Zielsequenz für die jeweiligen Erreger kloniert. Als Vektor dienten dabei 3793 Basenpaare (bp) umfassende pCR-II-TOPO-Plasmide, die in *Escherichia coli* (*E. coli*) etabliert waren. Ausgewählte Kolonien solcher rekombinante *E. coli*-Stämme wurden in Flüssigkulturen mit Ampicillin geimpft und diese bei  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  über Nacht bebrütet. Nach der Ernte der *E. coli*-Zellen und der Zelllyse erfolgte die Aufreinigung mittels eines kommerziellen Substrats entsprechend der Herstelleranweisung (Qiagen). Durch die anschließende photometrische Messung wurde der DNA-Gehalt bestimmt. Die Proben wurden mit TE-Puffer (10 mM TrisHCl, 0,1–1 mM EDTA, pH 7,5–8,0) auf 1 ng/μl verdünnt und Verdünnungsreihen in 1:10-Stufen hergestellt.

### **2.1.3 Referenzstämmen**

Als Referenzmaterial dienten Bakterienstämmen von Konsiliar- oder Referenzlaboratorien, aus Patientenkulturen sowie aus Wasserproben (Gewinnung einiger Legionellen-Stämme, GVPC-Agar bei  $35^\circ\text{C}$  im  $\text{CO}_2$ -Brutschrank über 3–7 Tage).

Die Kontrollsammlung als interne Referenzgruppe beinhaltete die folgenden Stämme:



- *Mycobacterium tuberculosis* R 37
- *Mycobacterium tuberculosis* Wildtyp (Patientenisolat)
- *Mycobacterium bovis* (Patientenisolat)
- *Chlamydomonas pneumoniae* T183 DSMZ 124
- *Chlamydomonas pneumoniae* Wildtyp (Patientenisolat)
- *Mycoplasma pneumoniae* ATCC 29342
- *Mycoplasma pneumoniae* Wildtyp (Patientenisolat)
- *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 ATCC 33152
- *Legionella pneumophila* Wildtyp (Patientenisolat)
- *Legionella jordanis* Wildtyp (Patientenisolat)
- *Legionella anisa* (aus Wasserprobe)
- *Legionella rubrilucens* (aus Wasserprobe)

PD Dr. rer. nat. Elvira Richter vom Nationalen Referenzlabor für Mykobakterien Borstel erweiterte die Mykobakteriensammlung um einige MOTT-Stämme. Von Dr. rer. nat. Konrad Sachse, Nationales Referenzlabor für Psittakose, Friedrich-Löffler-Institut, Jena stammten einige der Chlamydienstämme, während Prof. Dr. med. Andreas Essig, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Ulm, einige Mykoplasmenstämme zur Verfügung stellte. Dr. med. Paul Christian Lück sandte freundlicherweise 16 Legionellenstämme in Form von aufgereinigter DNA und Kulturen aus dem deutschen Konsiliarlabor für Legionellen, Technische Universität Dresden.

## 2.2 Grundlagen

### 2.2.1 Anforderungen an Zielsequenzen, Primer und Sonden

Die Zielsequenz der ausgewählten Genorte sollte hochspezifisch für die jeweiligen Erreger stehen. Lag die ausgewählte Genregion in multipler Kopienzahl im Genom vor, erhöhte sich zusätzlich die Sensitivität des Nachweises. Repetitive Sequenzen sollten vermieden werden, ebenso ein hoher Guanin/Cytosin-Gehalt, da sonst höhere Schmelztemperaturen nötig waren. Eine Amplikongröße von < 150 bp wurde angestrebt [41].

Die Generierung von hochspezifischen und sensitiven Primern erfolgte unter Berücksichtigung der folgenden Parameter:

- ein ausgeglichener Guanin/Cytosin- zu Adenin/Thymin-Gehalt
- eine ähnliche Schmelztemperatur der 5'- und 3'-Primer
- Vermeidung der Bildung von Primerdimeren
- Vermeidung von langen Poly(N)- oder Guanin/Cytosin-Abschnitten insb. am 3'-Ende (Gefahr des mispriming = Fehlpaarung von Primer und Matrize durch Sekundärstrukturen)

Bei der Auswahl der Sonden musste die relative Entfernung zur Lage der Primer berücksichtigt werden. Auch hier wurden repetitive Sequenzen vermieden. Optimal lag der Sondenschmelzpunkt 8–10 °C höher als der der Primer.

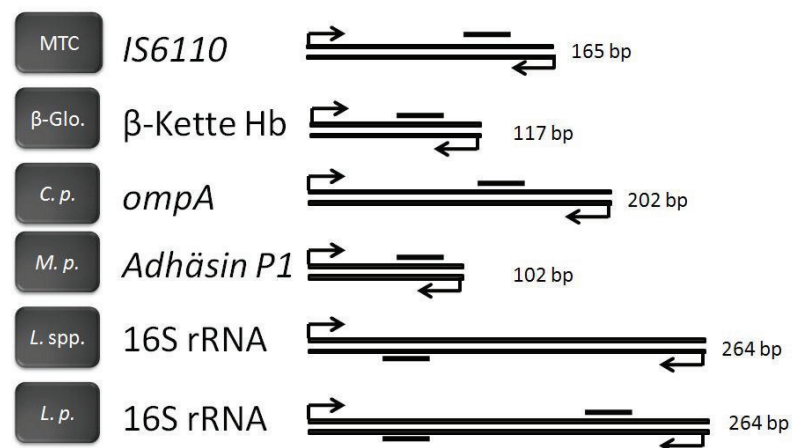
### 2.2.2 Zielgene

Die Wahl der Zielregionen der Genorte orientierte sich an etablierten, in jeweils mehreren Publikationen beschriebenen, vollständig sequenzierten Genregionen. Die gewählten Regionen sind hochspezifisch für die jeweiligen Erreger. Die entsprechenden Primer und Sonden wurden, mit Ausnahme des 5'-Legionellen- und des 5'- $\beta$ -Globin-Primers sowie der  $\beta$ -Globin-Sonde, eigens für dieses Verfahren entwickelt.

Für den MTK-Nachweis wurde das 1361 bp große Insertionselement *IS6110* gewählt. Das *IS6110* als Zielgen wird seit 1991 verwendet und dient auch bei etablierten kommerziellen Kits als Zielregion [106-111]. Es ist für alle MTK-Bakterien identisch und ermöglicht keine Differenzierung zwischen den MTK-Erregern, ließ sich bisher jedoch nicht bei MOTT-Erregern nachweisen. Bei den MTK-Spezies liegt das Gen in unterschiedlicher Kopienzahl vor, so dass die Empfindlichkeit der PCR variieren kann. Bei *M.-bovis*-Stämmen z. B. gibt es nur 1–3 Kopien, während bei *M.-tuberculosis*-Stämmen 1–20 Kopien vorliegen können [112-115].

Der Detektion von *C. pneumoniae* diene das *ompA*-Gen und der Analyse von *M. pneumoniae* das *Adhäsion-P1*-Gen. Das 16S ribosomale DNA-Gen für *Legionella* spp. und *L. pneumophila* liegt genau wie das *IS6110*-Element in multipler Form im Genom vor und erhöht somit die Sensitivität des Nachweises [49].

Zur Inhibitionskontrolle wurde ein publiziertes Protokoll von Klaassen et al. 2003 [116] modifiziert und integriert. Ursprünglich bezog sich der  $\beta$ -Globin-Nachweis auf humane DNA in Fäzes zur Karzinomdetektion und arbeitete mit einem anderen Temperaturprofil. Der 5'-Primer und die Sequenz für die TaqMan-Sonde wurden übernommen. Durch die Vergrößerung des Amplikons und die Wahl des 3'-Primers wurde der Nachweis für das Multiplex-Verfahren angepasst und optimiert. Einen schematischen Überblick über die Zielgene, die Größe der Amplifikate und die Lage von Primern und Sonden stellt Abbildung 8 dar.



**Abbildung 8: Graphische Darstellung von Zielgenen und Amplifikaten**

Zur Verdeutlichung der Relation der Amplifikatgrößen ist an dieser Stelle für jeden Einzelnachweis das jeweilige Amplifikat dargestellt. Die Pfeile stellen dabei maßstabsgetreu zur Amplikonlänge die Primer und die kurzen Striche die Sonden dar.

### 2.2.3 Fluoreszenz und Farbstoffe

Das Fluoreszenzoptimum wird vom RT-Instrument optisch detektiert, elektronisch verstärkt, digital mit entsprechenden Algorithmen gegen die anderen Farbkanäle und Hintergrundstrahlung verrechnet und entsprechend der Wellenlänge dem jeweiligen Farbstoff zugeordnet. Es gibt Ein-, Zwei- und Vierkanalgeräte, die beim gleichzeitigen Einsatz von mehreren Sonden mit verschiedenen Farbstoffen zwischen den einzelnen Signalen differenzieren können. Da es sich bei Fluoreszenz jedoch immer annäherungsweise um eine Gauß-Kurve mit Optimum handelt, können Farbstoffe mit eng nebeneinanderliegenden Spektren bei sehr hoher Konzentration des amplifizierten Genabschnittes und entsprechend großen Fluoreszenzsignalen nicht sauber getrennt werden und es kommt zur Interferenz.

Dieses Problem wurde bei der Wahl der Farbstoffe berücksichtigt. Die Fluoreszenzspektren der verwendeten Farbstoffe 6-Carboxyl-Fluorescein (FAM; Exzitation  $\lambda_{\max}$  493 nm, Emission  $\lambda_{\max}$  515 nm) und Yakima Yellow (YY; Exzitation  $\lambda_{\max}$  530 nm, Emission  $\lambda_{\max}$  550 nm [117]) liegen relativ weit auseinander.

Da VIC (Exzitation  $\lambda_{\max}$  538 nm, Emission  $\lambda_{\max}$  554 nm) (ABI, Foster City, USA) fast dasselbe Fluoreszenzspektrum wie YY hat, kann YY statt VIC alternativ verwendet werden. Aus patentrechtlichen Gründen sind YY-Sonden deutlich preisgünstiger.

Zu den bekanntesten Dark-Quenchern gehören Dabcyl und Methlyorange. Der hier verwendete Dark-Quencher BlueBerryQuencher (BBQ) ist für TaqMan-Sonden besonders gut geeignet, da er zu extrem niedrigen Hintergrundsignalen führt und nicht fluoresziert (Berry & Associates, Inc, Dexter, MI, USA). Die Produktion der Sonden erfolgte von TIB MOLBIOL, Berlin. Einen Überblick über die verwendeten Sonden und Primer stellt Tabelle 1, S. 39 dar.

## 2.3 DNA-Präparation

### 2.3.1 Prinzip

Um einen optimalen Ablauf der PCR zu gewährleisten, ist die Kontrolle und Elimination von Störfaktoren schon im Vorfeld sehr wichtig. Erheblichen Einfluss haben dabei inhibitorische Substanzen aus den Probematerialien. Dies sind in erster Linie:

- Nukleasen, die in fast jedem Probenmaterial enthalten sind
- ionische Detergenzien wie Natriumdodecylsulfat (SDS)
- Proteinasen (auch Proteinase K)
- Heparin

Die Aufbereitung und Reinigung der Proben vor dem Einsatz in der PCR ist daher unerlässlich.

Es erfolgte ein kombinierter thermischer und enzymatischer Aufschluss der Bakterienzellen mittels der Proteinase K, dann die Bindung von DNA und RNA an eine Siliziumdioxid-Säule und schließlich die Reinigung der Proben zur Entfernung

von Proteinen und anderen Verunreinigungen. Zur Eluation wurden Niedrig-Salz-Puffer verwendet. Das entstandene Aliquot wurde direkt für die PCR eingesetzt.

### **2.3.2 Vorbereitende Dekontamination**

Alle auf Mykobakterien verdächtigten Proben wurden unter der Sicherheitswerkbank Klasse II unter Vermeidung von Aerosolbildung im S3-Labor aufbereitet und für die kulturelle Anzucht angereichert.

Liquor wurde sedimentiert; EDTA-Blut wurde durch Zentrifugation (10 min bei  $3000 \times g$ ) in buffy coat und Plasma getrennt. Die Dekontamination eines Einsatzvolumens von 200 µl erfolgte durch 20-minütiges Erhitzen im Heizblock bei 95 °C, dreimaliges Gefrieren und Auftauen von –196 °C auf 100 °C und anschließende Zentrifugation bei  $3000 \times g$  bei 20 °C für 5 min.

Die Außenseite der Probengefäße wurde vor dem Ausschleusen mit 70%igem Ethanol für 5 min desinfiziert.

### **2.3.3 Durchführung**

Für die NAT bestimmte Proben wurden manuell entsprechend der Qiagen Arbeitsanleitung für den QIAamp DNA Mini Kit bearbeitet. Ein Teil der Proben wurde auch mittels des NucliSENS-easy-MAG-Extraktionsautomaten (bioMérieux/Hitachi, Nürtingen, Deutschland) aufgereinigt (Standardarbeitsanweisung MD AS BA /16 02 08 des akkreditierten Labors). Dabei fanden alle Schritte mit Ausnahme der Lysepufferzugabe und der Lyse, die separat unter der Sicherheitswerkbank erfolgten, im Gerät selbst statt.

Aliquots von 1–2 ml Patientenmaterial wurden für ein Zielvolumen von ca. 200 µl für 10 min bei  $3000 \times g$  bei Raumtemperatur zentrifugiert. Abstriche wurden mit 2–5 ml 0,9%iger Natriumchloridlösung gewaschen, mit  $3000 \times g$  für 10 min bei 20 °C zentrifugiert und der Überstand bis auf 300 µl verworfen. Gewebeproben aus Paraffinblöcken wurden zerkleinert, im Vortex gemischt und nach Entparaffinierung mit Xylol und Isopropanol direkt eingesetzt. Kulturmaterial wurde in 200–400 µl destilliertem Wasser gelöst.

Entsprechend der Arbeitsanleitung des Herstellers erfolgte die DNA-Aufreinigung. In den einleitenden Schritten wurden dabei DNA und RNA an eine Siliziumdioxid-

Membran gebunden. Im Anschluss wurden die DNA-Pellets mit verschiedenen Waschpuffern gewaschen, in 50 µl Eluationspuffer (10 mM TrisHCl; 0,5 mM EDTA; pH 9,0) resuspendiert und bei – 20 °C gelagert. Ein Einsatz von ca.  $10^7$  Zellen oder 25 mg Gewebe ergab eine DNA-Menge von etwa 35 µg DNA in 50 µl Lösung (bei einem Einsatz von 1 ml Probe, konzentriert auf 200 µl).

Die photometrische Messung der DNA-Konzentration diente der Möglichkeit der Bestimmung des einzusetzenden Volumens der Patientenprobe an den Zielbereich von 200–400 ng (ca. 1–10 µl).

Unter Verwendung von TEA-Puffer (10 mM TrisHCl, 8,3 mM EDTA) wurden mit dem gewonnenen Material Verdünnungsreihen mit dem Faktor 1:10 für die Referenz-DNA-angefertigt. Bis zum Einsatz wurden die Proben im Kühlschrank bei 2–8 °C maximal acht Stunden aufbewahrt oder längerfristig bei – 20 °C gelagert.

## 2.4 Real-Time-PCR

Der Erfolg einer Nukleinsäure-Amplifikations-Technik hängt von verschiedenen Kriterien ab. Wichtig ist die Entfernung inhibitorischer Substanzen durch eine geeignete Aufreinigung (s. o.). Weiterhin sollte die Präparation mit großer Sorgfalt erfolgen, um eine Kontamination durch fremde Nukleinsäuren zu vermeiden.

Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Konzentration von Primern, Sonden,  $MgCl_2$  und DNA. Die Primer-Konzentration pro Reaktion sollte zwischen 50 und 900 nM und die Sonden-Konzentration zwischen 100 und 500 nM liegen [118]. In diesen Experimenten wurde eine mittlere Primer- bzw. Sondenendkonzentration von 400 nM bzw. 130 nM als hinreichend betrachtet. Optimal war ein DNA-Gehalt von ca. 200 ng pro Probe.

### 2.4.1 Primer und TaqMan-Sonden

Die verwendeten Primerpaare und Sonden wurden eigens für dieses Detektionssystem konzipiert und hinsichtlich des Temperaturprofils und der Arbeitsbedingungen optimiert (Tabelle 1). Ausnahmen stellen die 5'-Primer für  $\beta$ -Globin und Legionellen und die  $\beta$ -Globin-Sonde dar. Zur Entwicklung der Primer und Sonden wurde das Computerprogramm „Primer-Express“ verwendet, Hinweise von Mitarbeitern der Firma TIB MOLBIOL wurden berücksichtigt. Die Synthese der

Oligonukleotide führten die Firmen ABI, Biopolymers, MWG, Eurogentec und TIB MOLBIOL durch.

Erregernachweis	Sequenz	Position	Größe in bp	Schmelz- punkt in °C
<b><i>M. tuberculosis</i></b>			(165)	
5'-Primer (TB_F)	5'-CgAACggCTgATgACCAAAC	1173–1193	20	61,0
3'-Primer (TB_R)	5'-CgACACATAggTgAggTCTgCTAC	1315–1338	23	58,5
Sonde TB_TM	5'-6FAM-ATCTCgTCCAgCgCCgCTTCggAC-BBQ	1268–1291	24	71,5
<b><i>β-Globin</i></b>			(118)	
5'-Primer (Glo_up)	5'-gggCAACgTgCTggTCTg	63487–63504	18	61,0
3'-Primer (Glo_down)	5'-ATACTTgTgggCCAgggCAT	63604–63585	20	62,0
Sonde Glo_TM	5'-6FAM-CTggCCCATCACTTTggCAAagAA-BBQ	63509–63532	24	66,4
<b><i>C. pneumoniae</i></b>			(202)	
5'-Primer (CP_F)	5'-gCCTgTAgggAACCTTCTgA	24–44	21	59,2
3'-Primer (CP_R)	5'-ggATCCAgTAggCTTggCTC	228–209	20	57,3
Sonde CP_TM	5'-YY-TACTTggTgCgACgCTATTAgCTTACgTg-BBQ	111–139	29	66,3
<b><i>M. pneumoniae</i></b>			(102)	
5'-Primer (MP_F)	5'-ATCAACCCgCgCTTAACC	307–324	18	57,7
3'-Primer (MP_R)	5'-TgTTgTCgCgCACTAAggC	409–391	19	60,1
Sonde MP_TM	5'-6FAM-AAgCTCgTgTTACgATACgTTCACggg-BBQ	350–324	27	66,0
<b><i>Legionella spp.</i></b>			(243)	
5'-Primer (LG_5A)	5'-AgggTTgATAggTTAAgAgC	451–470	20	70,0
3'-Primer (LG_II3)	5'-TCACCGCTACACCGgAAATTCC	694–673	22	63,2
Sonde LGII_TM	5'-YY-AgCCggTgCTTCTCTgTgggTAAC-BBQ	484–508	25	61,4
<b><i>L. pneumophila</i></b>			(243)	
5'-Primer (LG_5A)	5'-AgggTTgATAggTTAAgAgC	451–470	20	70,0
3'-Primer (LG_II3)	5'-TCACCGCTACACCGgAAATTCC	694–673	22	63,2
Sonde LP_TM	5'-FAM-CCTgggACggTCAgATAATACTggTTg-BBQ	623–649	27	64,5

**Tabelle 1: Primer und Sonden**

( ) Amplikongröße in bp

## 2.4.2 Mastermix und Übertragbarkeit auf andere Real-Time-Systeme

Der Mastermix stellt in der PCR die Basislösung mit Pufferfunktion durch  $MgCl_2$ , Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) und DNA-Polymerase dar. Er enthält

äquimolare Mengen der vier dNTPs dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Die Taq-Polymerase ist ein Enzym des Bakteriums *Thermophilus aquaticus* und besitzt eine Elongationsgeschwindigkeit von > 1000 Nukleotiden pro Minute. Sie besitzt keine Korrekturfunktion, aber eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, die bei den TaqMan-Sonden genutzt wird (vgl. 1.5.2). Das Temperaturoptimum der 94 kDa Taq-Polymerase liegt bei 70–80 °C [102].

Zu Beginn der Arbeit wurde an vier Real-Time-Instrumenten verschiedener Hersteller gearbeitet:

- Opticon 2 (Bio-Rad Laboratories)
- ABI Prism 7000 Detector (Applied Biosystems)
- Mastercycler ep realplex (Eppendorf AG)
- StepOnePlus (Applied Biosystems)

Je nach Gerät musste der Mastermix angepasst werden. Dabei wurden folgende kommerzielle Mastermixe verwendet:

- Eurogentec qPCR MasterMix Plus Low ROX (Eurogentec)
- Eurogentec qPCR MasterMix (Eurogentec)
- Quantifast SYBR Green PCR Kit (Qiagen)
- Qiagen Quantifast Probe PCR + ROX Vial Kit (Qiagen)
- TaqMan 2× Universal PCR Master Mix No AmpEraseUNG (Applied Biosystems)

Die besten Ergebnisse wurden mit dem TaqMan 2× Universal PCR Master Mix am StepOnePlus-Gerät erreicht.

Das Gesamteinsatzvolumen betrug dabei 25 µl bei der Etablierung der Einzelnachweise und 35 µl bei der dualen Detektion.

### **2.4.3 Durchführung der Standard-Real-Time-PCR**

Sämtliche Einzelschritte der Vorbereitung wurden in getrennten Räumlichkeiten mit separaten Arbeitsutensilien vorgenommen:



Arbeitsschritt	Ort
Anzucht und Vorbereitung der Kolonien	Raum 231, 220
Manuelle Aufreinigung der DNA	Raum 006
Automatisierte Aufreinigung der DNA	Raum 314
Ansatz Mastermix, Primer und Sonden	MM-Raum (Raum 306)
Zugabe des gereinigten Patientenmaterials unter Abzug	Raum 314
Zugabe der Referenz-DNA	Raum 315, 012
Standort der PCR-Geräte	Opticon 2, StepOnePlus: Raum 315 ABI Prism 7000, Mastercycler: andere Abteilung

**Tabelle 2: Standorte für die einzelnen Arbeitsschritte der Experimentvorbereitung**

Die Reaktionsbasisansätze wurden im Mastermixraum unter besonderen hygienischen Richtlinien in sterilen, autoklavierten 1,5-ml-Eppendorfgefäßen entsprechend der berechneten Mengen zusammengestellt. Tabelle 3, Tabelle 4 und Tabelle 4: Reaktionsansatz Duplex-RT-PCR geben die genaue Zusammensetzung des Ansatzes für die Monoplex- und die Duplexvariante (zwei Erregernachweise in einer Kavität) wieder:

Substanz	Primäre Konzentration	Finale Konzentration	Eingesetzte Menge
TaqMan 2× Universal PCR Master Mix	–	–	17,5 µl
5'-Primer	10 µM	0,4 µM	1,4 µl
3'-Primer	10 µM	0,4 µM	1,4 µl
TaqMan-Sonde	5 µM	0,13 µM	0,9 µl
H <sub>2</sub> O	–	–	7,8 µl
DNA	variabel	variabel	6,0 µl
			Σ 35 µl

**Tabelle 3: Reaktionsansatz Monoplex-RT-PCR**

Substanz	Primäre. Konzentration	Finale Konzentration	Eingesetzte Menge
TaqMan 2× Universal PCR Master Mix	2-fach	1-fach	17,5 µl
5'-Primer A	10 µM	0,4 µM	1,4 µl
3'-Primer A	10 µM	0,4 µM	1,4 µl
5'-Primer B	10 µM	0,4 µM	1,4 µl
3'-Primer B	10 µM	0,4 µM	1,4 µl
TaqMan-Sonde A	5 µM	0,13 µM	0,9 µl
TaqMan-Sonde B	5 µM	0,13 µM	0,9 µl
H <sub>2</sub> O	–	–	4,1 µl
DNA	variabel	variabel	6,0 µl
			Σ 35 µl

**Tabelle 4: Reaktionsansatz Duplex-RT-PCR**

Substanz	Primäre. Konzentration	Finale Konzentration	Eingesetzte Menge
TaqMan 2× Universal PCR Master Mix	2-fach	1-fach	17,5 µl
5'-Primer	10 µM	0,4 µM	1,4 µl
3'-Primer	10 µM	0,4 µM	1,4 µl
TaqMan-Sonde A	5 µM	0,13 µM	0,9 µl
TaqMan-Sonde B	5 µM	0,13 µM	0,9 µl
H <sub>2</sub> O	–	–	6,9 µl
DNA	variabel	variabel	6,0 µl
			Σ 35 µl

**Tabelle 5: Reaktionsansatz Legionellen-RT-PCR**

Daraufhin erfolgte die Verteilung des Reaktionsbasisansatzes von 29 µl auf die entsprechenden Gefäße, Achter-Ketten (optical tubes) oder 96-Kavitäten-Mikrotiterplatten und ggf. das vorübergehende Verschließen mit optischen Verschußstreifen. In separaten Räumen erfolgte unter Klasse-II-Sicherheitswerkbänken mit aerosoldichten Pipettenspitzen die Zugabe von 6 µl extrahierter und aufgearbeiteter Patienten- oder sonstiger Proben-DNA. In wiederum anderen Räumlichkeiten wurden dann die Positivkontrollen und die Kavitäten endgültig mit optischen Verdeckelungsstreifen oder Kunststoffolie versiegelt. Vor dem Start der PCR wurden die Ansatzträger kurz anzentrifugiert und vorsichtig, berührungs- und staubarm im Silberblock des StepOnePlus-Instrumentes platziert.

Als Positivkontrollen wurden je 3 µl rekombinante Plasmid-DNA aus Verdünnungsreihen-Standards der Konzentrationen 1 pg, 10 fg und 1 fg entsprechend 1.500.000, 15.000 und 1.500 Kopien zugesetzt. Für Legionellen galten dieselben Konzentrationsangaben. Die Kontroll-DNA des Stammes *L. pneumophila* fungierte dabei als Kontrolle für beide Legionellen-Nachweise. Für MTK-Bakterien wurden 6 µl rekombinante Plasmid-*IS6110*-DNA der Konzentration 1 pg, 10 fg und 1 fg entsprechend ca. 250.000, ca. 2.500 und ca. 250 Kopien zugesetzt. In Genom-Äquivalente (genome equivalents GE) umgerechnet entspricht dies ca. 10 GE bzw. bei *M. bovis* ca. 100 GE aufgrund der geringeren Kopienzahl pro Genom.

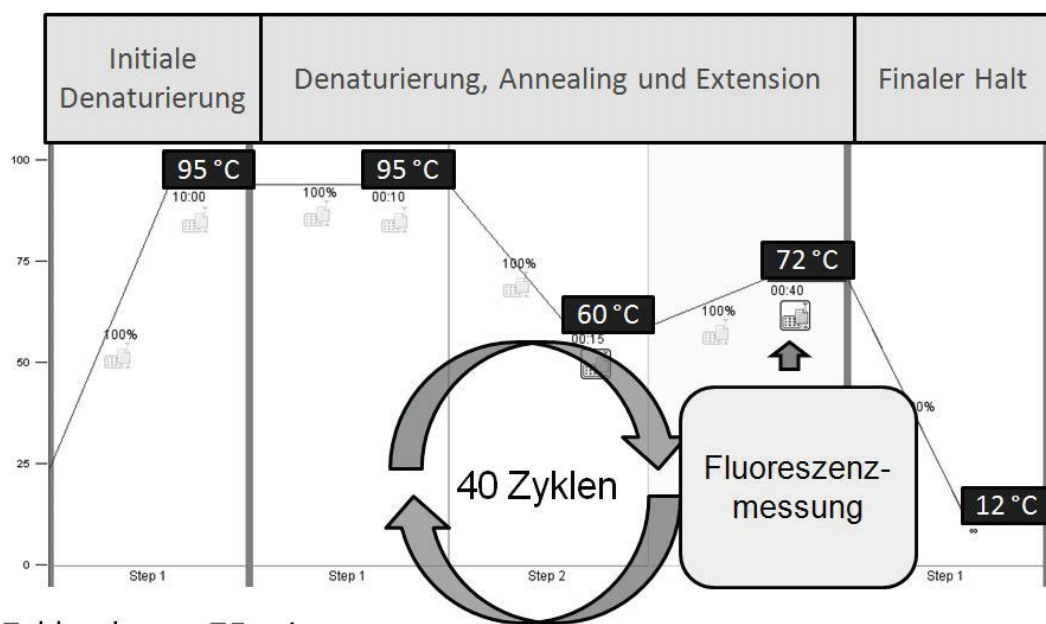
Als Negativkontrollen wurde Wasser aus dem Mastermix-Raum und Material von Beginn der Probenaufreinigung eingesetzt. Für jede zu untersuchende

Patientenprobe wurde eine Inhibitionskontrolle mit  $\beta$ -Globin in einer separaten Kavität auf derselben Platte mitgeführt.

#### 2.4.4 Temperaturprofil

Die PCR-Durchführung erfolgte am StepOnePlus-Instrument. Zur schnellen Detektion wurde ein Zwei-Schritt-Format (two-step-stage) benutzt, bei dem das Annealing und die Elongation auf einer Temperaturstufe bei 60 °C stattfanden. Nach initialer 10-minütiger Denaturierung bei 95 °C folgten 40 Zyklen, jeweils beginnend mit 95 °C für 10 s Denaturierung, dann 60 °C für Annealing und die Elongation über 40 s. Zum Abschluss wurden die Proben auf 12 °C gekühlt. Der gesamte Lauf dauerte 56 min.

Beim Legionellen-Nachweis erwies sich eine höhere Elongationstemperatur als effektiver. Analog wurde bei 95 °C 10 min lang denaturiert. Jeder der 40 folgenden Zyklen bestand aus 10 s Denaturierung bei 95 °C, Annealing bei 60 °C für 15 s und für 45 s Elongation bei 72 °C (Abbildung 9).



Zyklusdauer: 75 min

**Abbildung 9: Temperaturprofil der RT-PCR**

*Quelle: Erstellung auf Basis der StepOnePlus-Software*

Der Lauf selbst dauerte 75 min, hinzu kamen 5–10 min für die Programmierung des Geräts. Bei der parallelen Detektion aller Zielgene wurde das Legionellen-

Temperaturprofil verwendet. Die Ergebnisse der Nachweise änderten sich dadurch nicht. Die PCR-Produkte in den Reaktionsgefäßen wurden bei 4 °C gelagert und teilweise mit einer Endpunkt-Fluoreszenzmessung ausgewertet.

#### **2.4.5 Bewertung**

Bei der Bewertung sollten zunächst die visuelle Darstellung und der Verlauf der Graphen kritisch betrachtet werden. Ein steiler Kurvenverlauf spricht für das Vorhandensein von Ziel-DNA und stattgefundenener Amplifikation. Bei niedriger DNA-Konzentration war der Schwellenwert (Threshold) einzublenden und ggf. manuell für jeden Fluoreszenzfarbstoff anzugleichen. Der Threshold-Cycle ( $C_t$ ) ist dabei ein Maß für die in der Probe enthaltene spezifische DNA-Menge und bezeichnet denjenigen Zyklus, bei dem das Reporterfluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz überschreitet.

Eine Patientenprobe wurde als positiv bewertet, wenn der  $C_t$  bei < 36 Zyklen lag.

Bei einem  $C_t$  von 36–38 Zyklen ist die Probe schwach-positiv und in jedem Fall kontrollbedürftig; die erfolgte zunächst in einfacher Wiederholung, dann mit erneuter Aufarbeitung des Originalmaterials mit Wiederholung der Inhibitionskontrolle.

Das Ergebnis wurde als negativ gewertet, wenn am Endpunkt der Messung kein Signal detektiert wurde bzw. der  $C_t$  > 38 Zyklen lag. Die Bewertung aller Laborergebnissen erfolgte immer im Kontext der klinischen Symptome des Patienten (Plausibilitätskontrolle).

Fakultativ zum Amplifikatnachweis mittels Fluoreszenzsonden wurden zum Teil Elektrophoreseverfahren durchgeführt, sofern die Amplifikatbande aufgrund ihrer Größe im Gel detektierbar war.

Korreliert die gemessene Amplifikatgröße nicht mit der vorhergesagten Größe, musste der Versuch in jedem Fall wiederholt werden. Die Spezifität des Amplikons sollte ggf. mittels Sequenzierung bestätigt werden.

Zur Durchführung der Inhibitionskontrolle bestanden prinzipiell zwei Verfahrensweisen: Entweder wurde die unbekannte Patientenprobe direkt untersucht oder eine definierte Menge  $\beta$ -Globin-Plasmid-DNA vor Reaktionsbeginn direkt in den Reaktionsansatz appliziert. Letzteres machte eine Wiederholung der

Messung aufgrund eines zu geringen Einsatzes an zellhaltigem Material überflüssig. Es wurde festgelegt, dass eine Probe mit einem  $C_t \leq 34$  Zyklen im entsprechenden RT-PCR-Ansatz als  $\beta$ -Globin-positiv galt.

Zur Fehleranalyse können die Ergebnisse der Positivkontrollen auch mit denen vorangegangener Experimente bezüglich der  $C_t$ -Werte und der Fluoreszenzoptima  $\Delta R$  verglichen werden. Bei Diskrepanzen war eine erneute Aufreinigung der Proben ggf. empfehlenswert.

## 2.5 Weitere Verfahren

### 2.5.1 Vergleichende Methodik

Alle neuen Real-Time-Nachweise wurden mit den alten PCR-Systemen aus der Routinediagnostik der Universität Rostock verglichen. Für MTK-Bakterien wurde zuvor ein PCR-Protokoll mit anschließender Hybridisierung nach Eisenach et al., 1990 [105] verwendet. Außerdem wurden sämtliche Patientenproben mit dem Goldstandard Kultur verglichen (2.1). Der Chlamydien-Nachweis erfolgte durch ein Nested-PCR-Protokoll von Tong et al., 1993 [119] und der Mykoplasmen-Nachweis durch ein Nested-PCR-Protokoll von Talkington et al., 1998 [120]. Für den Legionellen- und *L.-pneumophila*-Nachweis wurde ein PCR- und Hybridisierungsverfahren nach Jonas et al. 1995 [121] verwendet. Die Überprüfung der Referenzstämme erfolgte durch ein 16S-Protokoll von Medlin et al., 1988 [122].

### 2.5.2 Gelelektrophorese

Findet eine erfolgreiche Amplifikation statt, können die Amplifikate im Agarosegel ihrer Größe nach getrennt und mittels des nukleinsäurefärbenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid dargestellt werden. Aufgrund ihrer negativen Ladungen an den Phosphatgruppen wandern Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld zur Anode.

Aus Trockensubstanz und TAE-Pufferlösung wurde ein 1,5 %iges Agarosegel durch mehrmaliges Aufkochen in der Mikrowelle angefertigt und in Form gegossen. Dabei dienten Elektrophoresekämme für die Aussparung von acht bis zwölf Taschen. Nach Aushärtung wurde das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Flachgel-

Elektrophoreseeinheit gegeben. Die Taschen im Gel wurden mit 5 µl des PCR-Ansatzes aus einem Reaktionsgefäß und 2 µl Gelladepuffer befüllt. Eine standardisierte, neben den Proben platzierte 100-bp-Leiter diente der Größenzuordnung. Die Auftrennung der Probe fand bei einer Spannung von 110 V und einer Stromstärke von 100 mA in 40 min statt.

Die resultierenden Banden wurden 15 min lang in einem Ethidiumbromidbad (1mg/l) gefärbt, danach am UV-Transilluminator ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert (Abbildung 11, S. 49).

### **2.5.3 Schmelzkurvenanalyse**

SYBR-Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der wie Ethidiumbromid doppelsträngige DNA unspezifisch markiert. Allerdings erfolgt diese Bindung schon während des PCR-Durchlaufs und nicht erst im Anschluss daran. Im Laufe der Amplifikation bindet SYBR-Green I unspezifisch an doppelsträngige Amplifikate, Artefakte und Primer-Dimere, wobei das Fluoreszenzsignal proportional zu der Amplifikatmenge zunimmt. Bei der Analyse von Schmelzkurven wird die erste Ableitung der Änderung des Fluoreszenzsignal  $\Delta F$  pro Zeiteinheit zu  $\Delta T$  betrachtet. Dazu werden nach Ablauf der PCR die Doppelstränge bei ansteigender Temperatur im Schmelzkurvenmodus denaturiert und in Einzelstränge getrennt. Der Fluoreszenzfarbstoff löst sich von der DNA, da er an Einzelstränge nicht binden kann. Die Abnahme der Fluoreszenz wird vom Gerät kontinuierlich detektiert und graphisch dargestellt.

Primerdimere schmelzen aufgrund ihrer geringen Größe bei niedrigeren Temperaturen und können so von spezifischen Amplifikaten differenziert werden (3.1.1, S. 47).

Im Vorfeld der Primerentwicklung wurde dieses Verfahren eingesetzt, um die Hybridisierung unter Primerpaaren zu analysieren und ggf. durch Wahl anderer Positionen zu optimieren. Eine hohe Primerdimerbildung war nicht erwünscht, weil dann weniger Primer für die spezifische Amplifikation vorlagen.

## 3 Ergebnisse

Der Entwicklungsprozess dieses Diagnoseverfahrens gliedert sich in drei verschiedene Abschnitte. Zu Beginn stand die Etablierung der Einzelnachweise. Dazu gehörten die Auswahl geeigneter Zielgene und die praktische Prüfung der Bestandteile für jeden Einzelnachweis. Anschließend folgte die Optimierung jedes Einzelnachweises durch eine Vielzahl von Experimenten sowie die Vereinheitlichung des Temperaturprofils. Im zweiten Schritt wurden jeweils zwei Nachweise als Duplex-Verfahren zusammengelegt und praktisch überprüft. Im dritten und letzten Schritt der Entwicklung wurden alle Verfahren in Hinblick auf Sensitivität, Spezifität, Wiederholbarkeit, Linearität und Kreuzreaktivität intern und extern validiert.

### 3.1 Einzelnachweise

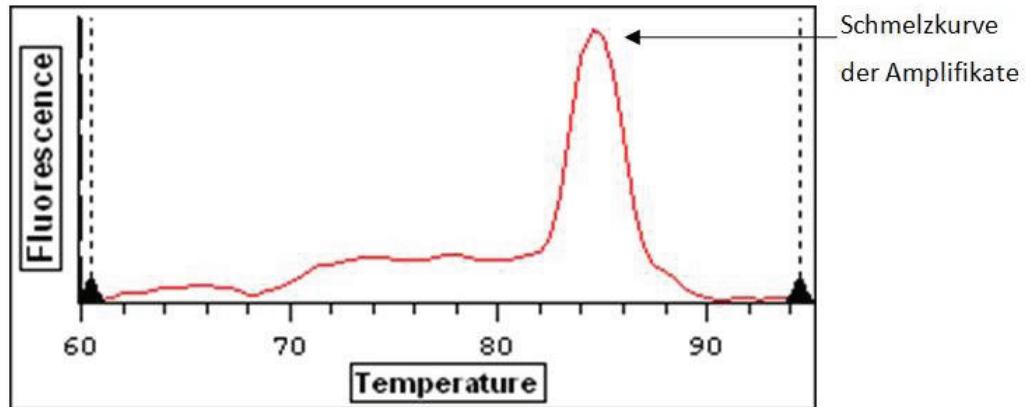
#### 3.1.1 Generierung und Prüfung von Primern und Sonden

Für die DNA-Detektion der Pneumonieerreger wurden fünf verschiedene Erreger-RT-PCR-Nachweise und eine RT-PCR-Inhibitionskontrolle konzipiert. Die Auswahl der Genorte orientierte sich dabei an der aktuellen Literatur (vgl. S. 80). Die gewählten Oligonukleotidsequenzen der Primer und Sonden wurden mit der GenBank abgeglichen; danach erfolgte die experimentelle Untersuchung einzelnen Parameter für jeden Einzelnachweis.

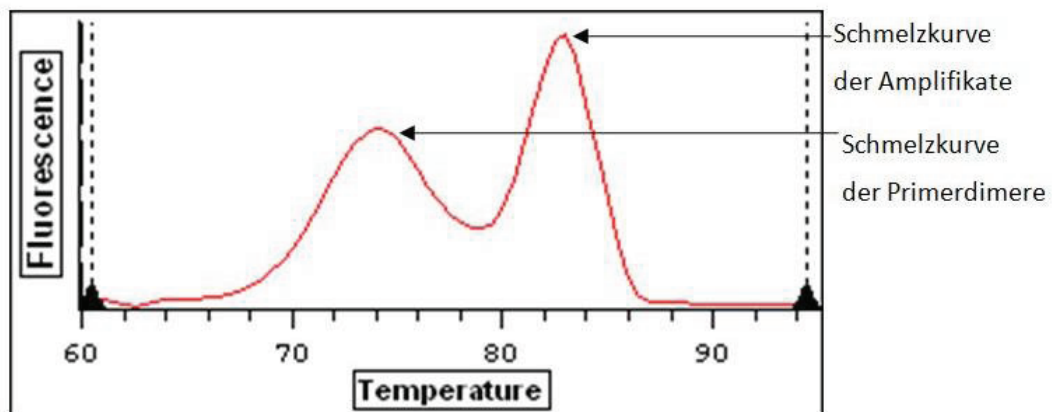
Zur Dokumentation der adäquaten Bindung von Primern an die Zielsequenz waren die Darstellung von Schmelzkurven mit SYBR-Green I sowie das Auftragen des Reaktionsprodukts im Elektrophoresegel wichtig.

Die Abbildung 10 A und B veranschaulicht die Schmelzkurven von Primern.

Zusammengefasst zeigten die Schmelzkurven für die letztendlich ausgewählten Primer nur je eine spezifische Spitze im hohen Temperaturbereich zwischen 81 und 84 °C mit Hinweis auf die Denaturierung spezifischer Amplifikate. Andere Primerpaare hatten aufgrund unspezifischer Homologie oder Primerdimerbildung einen zweiten Temperaturgipfel im Bereich von 71 bis 76 °C zu verzeichnen.



**Abbildung A: Schmelzkurve von Primern**



**Abbildung B: Schmelzkurve von Primern mit Dimerbildung**

#### **Abbildung 10: Schmelzkurven von *M. pneumoniae*-Primern**

Abbildung A zeigt das Fluoreszenzprofil eines Amplifikats von *M. pneumoniae*-rekombinanter-DNA mit der Ausgangsverdünnung 30 fg/μl unter Verwendung des Originalprimerpaars MP\_F und MP\_R. In Abbildung B ist dieselbe Probe mit dem Primerpaar MPEX1, MPEX2 nach Talkington et al, [120] mit einer ausgeprägten Dimerbildung zu sehen.

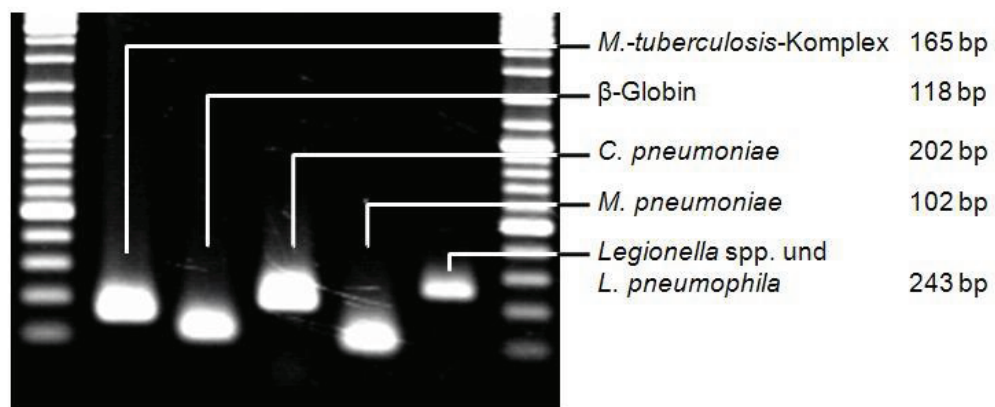
Als Referenzmaterial diente zunächst nur rekombinante Plasmid-DNA in 1:10-Verdünnungsreihen, wovon je 2,5 μl DNA-Lösung in der Konzentration von 0,1 fg/μl–100 pg/μl getestet wurden. Später stellte der Einsatz von chromosomaler DNA aus kultivierten Bakterienstämmen sicher, dass die Primer auch bei komplexer DANN zuverlässig ohne Dimerbildung bei der erwünschten Temperatur arbeiteten. Die gewählten Konzentrationen von Primern und Sonden orientierten sich an der gängigen Literatur (vgl. 2.4.1): Mit einer mittleren Primer- bzw. Sondenendkonzentration von 400 nM bzw. 130 nM wurden gute Ergebnisse erzielt. Experimente mit Primerkonzentrationen im Bereich von 600–1200 nM erbrachten keine Vorteile. Eine Veränderung der Sonden-Konzentration auf 150–390 nM



änderte ebenfalls nichts an den experimentellen Ergebnissen. Getestet wurden auch die Effekte einer gleichzeitigen Erhöhung der Primer- und Sondenkonzentration, jedoch führte dies zu schlechteren Fluoreszenzsignalen. Vor diesem Hintergrund und unter Berücksichtigung finanzieller Konsequenzen blieben die Konzentrationen bei 400 nM bzw. 130 nM.

Zur Qualitätskontrolle während der Entwicklungsphase I und II wurden Reaktionsprodukte aus dem Real-Time-PCR-Versuch nach stattgefundener Reaktion mittels Gelaufentrennung differenziert.

Die Amplifikation von Positivkontrollen mit erregerspezifischer DNA ergab dabei deutliche Banden im Bereich der vorgesagten Amplikongröße (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Amplifikate im Elektrophoresegel**

Dargestellt sind die Amplifikationsprodukte aus Real-Time-Versuchen mit der jeweiligen Erreger-DNA. Die Spuren rechts und links außen im Bild sind DNA-Basenleiter mit 100-bp-Stufen, zuunterst 100 bp, darüber 200 bp, darüber 300 bp etc.

Positive Proben mit *M. tuberculosis* zeigten die Amplikongröße von 165 bp, für *C. pneumoniae* 202 bp und β-Globin mit 118 bp. Die Amplifikate von *Legionella*spp.- und *L.-pneumophila*-positiven Proben waren gleichermaßen 243 bp groß; hier ist eine Spezieszuordnung zu *L. pneumophila* also nur über die Reaktion mit der speziesspezifischen Sonde oder über/durch eine Sequenzierung möglich. Das kleinste Amplifikations-Produkt mit 102 bp wurde mit der *M.-pneumoniae*-Ziel-DNA erhalten.

Im Verlauf der Untersuchungen fiel auf, dass die Darstellung der Ergebnisse nicht allein von den verwendeten Primern und Sonden beeinflusst wurde. Je nach

verwendetem Mastermix zeigten sich bei den Versuchen an den Geräten Opticon 2 und ABI Prism 7000 Detector (wobei am ABI-Gerät der passive Fluoreszenzfarbstoff ROX beige setzt werden musste) erhebliche Unterschiede in der Fluoreszenz und Dimerbildung im Gel. So musste für jedes der beiden Geräte sowie der später verwendeten Geräte gerätespezifisch ein optimaler Mastermix ausgetestet und verwendet werden.

Erregernachweis	Größe in bp/b	Schmelzpunkt in °C	Schmelzpunkt 2AT-4GC in °C	Schmelzpunkt Amplikon (experimentell) in °C	Optimale Arbeits- temperatur (experimentell) in °C
<b><i>M. tuberculosis</i></b>	165			88,13	62,5–64,1
5'-Primer (TB_F)	20	61,0	64,0		
3'-Primer (TB_R)	23	58,5	74,0		
Sonde TB_TM	24	71,5	80,0		
<b>β-Globin</b>	118			83,08	–
5'-Primer (Glo_up)	18	61,0	58,0		
3'-Primer (Glo_down)	20	62,0	51,6		
Sonde Glo_TM	24	66,4	82,0		
<b><i>C. pneumoniae</i></b>	202			79,67	62,5–64,1
5'-Primer (CP_F)	21	59,2	60,0		
3'-Primer (CP_R)	20	57,3	48,0		
Sonde CP_TM	29	66,3	72,0		
<b><i>M. pneumoniae</i></b>	102			82,65	55,8–58,3
5'-Primer (MP_F)	18	57,7	66,0		
3'-Primer (MP_R)	19	60,1	64,0		
Sonde MP_TM	27	66,0	86,0		
<b><i>Legionella</i> spp.</b>	243			82,05	–
5'-Primer (LG_5A)	20	70,0	58,0		
3'-Primer (LP_II3)	22	63,2	51,6		
Sonde LGII_TM	25	61,4	82,0		
<b><i>L. pneumophila</i></b>	243			82,05	–
5'-Primer (LG_5A)	20	70,0	58,0		
3'-Primer (LG_II3)	22	63,2	51,6		
Sonde LP_TM	27	64,5	78,0		

**Tabelle 6: Thermodynamische Schmelzpunkte von Primern, Sonden und Amplikons**

Die durch thermodynamische Formeln errechneten Primerschmelzpunkte konnten experimentell durch die Herstellung eines Temperaturgradienten von 55,0 °C bis 65,0 °C über die Heizblockoberfläche des Thermocyclers verifiziert werden. Beste Ergebnisse waren bei 62,5 °C bis 64,1 °C für *M. tuberculosis* und *C. pneumoniae*, sowie 55,8 °C bis 58,3 °C für *M. pneumoniae* zu verzeichnen. Die Abweichung vom errechneten Temperaturoptimum war dabei minimal (vgl. Tabelle 6). Die Wahl von

60 °C als Annealing- und Elongationstemperatur (bei einer PCR mit Two-Step-Stage) stellte so einen tragfähigen Kompromiss dar.

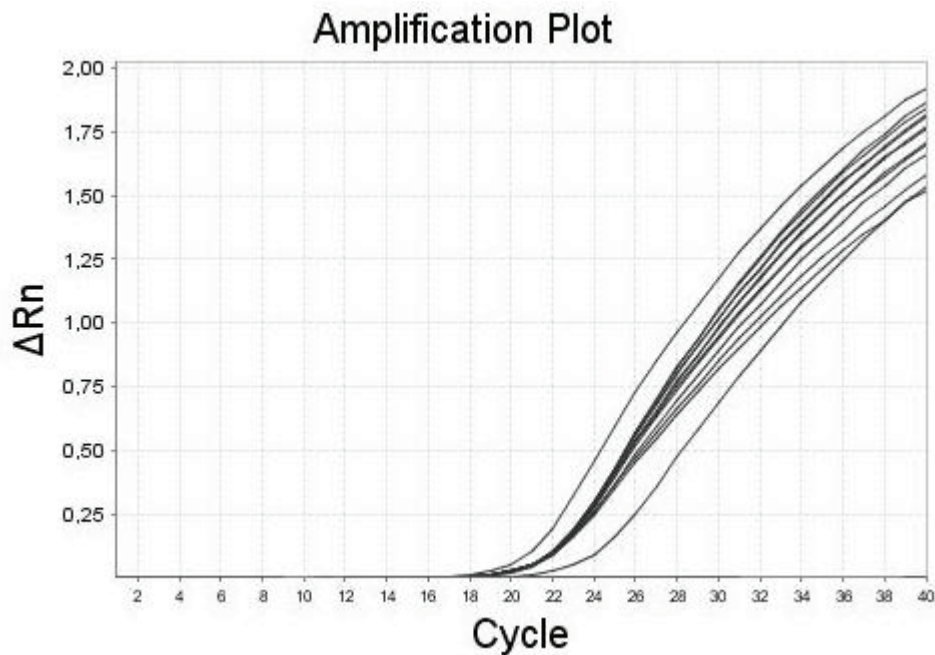
Für jeden PCR-Nachweis wurde die Sensitivität anhand von seriellen 1:10-Verdünnungslösungen mit dem passenden rekombinanten Plasmid von der genomischen DNA getestet. Außerdem wurde genomische DNA aus Patientenproben in variierenden Konzentrationen zwischen 5 ng/μl und 430 ng/μl zur Positivkontrolle hinzugesetzt.

### **3.1.2 Matrix-Effekt**

Der Matrix-Effekt bezeichnet die Veränderung eines Versuchsergebnisses durch Substanzen der Versuchslösung z. B. durch Inhibition. Zur Untersuchung des Matrix-Effekts wurden zehn Proben der definierten rekombinanten Plasmid-DNA-Lösung mit Patientenmaterial negativ getesteter Patienten versetzt. Der DNA-Gehalt variierte dabei von 13,9 ng/μl bis 220,9 ng/μl.

Die niedrigen DNA-Mengen korrelierten mit dem DNA-Gehalt der später verwendeten Patientenproben. Mit der Wahl des überdurchschnittlich hohen DNA-Gehalts > 100 ng/μl sollte eine mögliche Inhibition überprüft werden. Es zeigten sich keinerlei Unterschiede abhängig vom DNA-Gehalt, insgesamt ergab sich eine Abweichung von  $\pm 0,05$  Zyklen im Vergleich zur Leerwertmessung. Damit ist der Matrixeffekt vernachlässigbar.

Alle Nachweise konnten so angeglichen werden, dass bei gleichen Temperaturprofilen optimale Ergebnisse zustande kamen und somit eine simultane Durchführung aller Nachweise in einem Gerätelauf möglich war.



**Abbildung 12: Untersuchung des Matrix-Effekts**

Darstellung des Amplifikationsverhaltens von zehn definierten Proben zur Messung des Matrix-Effekts in Abhängigkeit von der Zeit.

### 3.1.3 Sonden und TaqMan-Farbstoffe

Ein essentieller Bestandteil für die Kombination von Nachweisen dieser Arbeit war die Wahl der Sonden und Farbstoffe. Die Spezifität des Einzelnachweises beruhte einerseits auf der Wahl der Primer, andererseits auf der Wahl der Sonde. Dies war besonders für die Legionellen-Nachweise von großer Wichtigkeit, da für die Amplifikation dasselbe Primerpaar genutzt wurde.

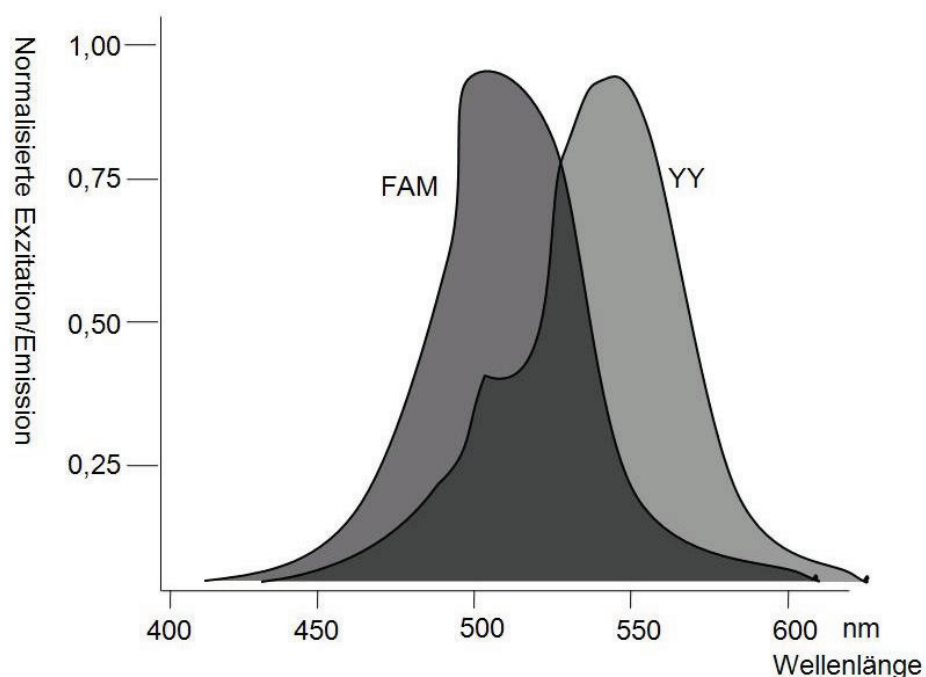
Die Sequenz einer jeden TaqMan-Sonde wurde zunächst gegen alle NCBI-Genbankeinträge auf etwaige Kreuzreaktivitäten geprüft. Dann wurde ihre spezifische Reaktivität mit rekombinanter Plasmid- und chromosomaler DNA getestet. Dies ermöglichte im Vergleich zur Verwendung von SBYR-Green I eine mindestens 10-fache Sensitivitätssteigerung.

Die Kombinierbarkeit der Nachweise wurde im Wesentlichen durch eine deutliche Abgrenzbarkeit der Fluoreszenzspektren der Sondenfarbstoffe voneinander beeinflusst. Die Prüfung erfolgte dabei auf theoretischer und praktischer Basis.

Die Wahl von FAM (6-Carboxyl-Fluorescein; Exzitation  $\lambda_{\max}$  493 nm, Emission  $\lambda_{\max}$  515 nm) wurde begünstigt durch die guten Fluoreszenzeigenschaften, die den

Farbstoff zu einem der bekanntesten und am häufigsten verwendeten TaqMan-Farbstoffe macht.

Der Farbstoff Yakima Yellow YY dagegen ist ein vergleichsweise neuer Fluoreszenzfarbstoff, dessen Fluoreszenz-Exzitationsmaximum  $\lambda_{\text{max}}$  bei 530 nm und dessen Emissionsmaximum  $\lambda_{\text{max}}$  bei 550 nm liegt [117]. Damit ist sein Fluoreszenzmaximum weit genug von dem des FAM entfernt und nahezu identisch wie das Fluoreszenzmaximum von VIC, einem seit langem etablierten Fluoreszenzfarbstoff (Exzitation  $\lambda_{\text{max}}$  538 nm, Emission  $\lambda_{\text{max}}$  554 nm).



**Abbildung 13: Fluoreszenzmaxima von FAM und Yakima Yellow**

Darstellung der Exzitations- und Emissionsmaxima für die Fluoreszenzfarbstoffe FAM und YY. Auffällig ist der Überlappungsbereich im Bereich von ca. 480–530 nm.

Quelle: erstellt auf der Zusammenführung von Diagrammen von [www.fluorophores.org](http://www.fluorophores.org) [117]

Bei der experimentellen Testung der Farbstoffe als Detektionsreagenz wies FAM erwartungsgemäß eine prinzipiell deutlich höhere Fluoreszenz  $\Delta R_n$  als YY auf, beispielsweise  $\Delta R_{n\text{FAM}} = 3,52$  anstatt  $\Delta R_{n\text{YY}} = 1,56$  bei der Reaktion mit rekombinanter *M. tuberculosis*-Plasmid-DNA in einer Konzentration von 100 pg/μl (vgl. auch Abbildung 14). Dagegen blieben die  $C_t$ -Werte und damit die Vergleichbarkeit der Nachweise unabhängig vom gewählten Fluoreszenzfarbstoff.

Nebenbefundlich zeigten sich bei der Testung hochkonzentrierter Proben mit entsprechend hohen Fluoreszenzsignalen auf einem Kanal auch Signale auf dem anderen Farbkanal. Betrachtet man die Fluoreszenzmaxima der verschiedenen Farbstoffe, fällt eine Überlappung im Bereich von ca. 480 bis 530 nm auf (Abbildung 13). Es liegt nahe, dass die Detektion eines Farbstoffs behindert wird, wenn der andere ihn überstrahlt. Firmenspezifische Algorithmen der jeweiligen Gerätesoftware gleichen dies aber zum Teil wieder aus. Dieser Effekt muss bei der Bewertung von mehreren Farbstoffen berücksichtigt werden, während er hier im Einzelnachweis eine untergeordnete Rolle spielte.

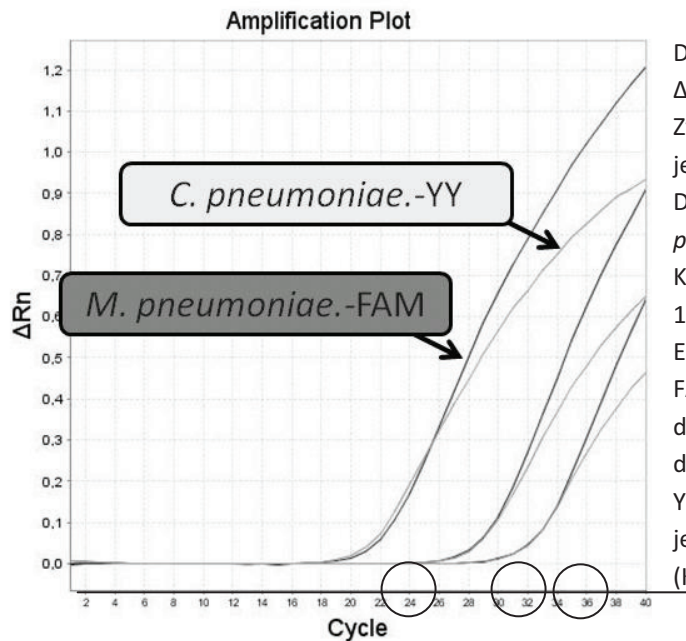
Die Kombination der beiden Farbstoffe FAM und YY wurde von der Firma TIB MOLBIOL vorgeschlagen, wird aber auch von der Firma Eurogentec favorisiert.

## 3.2 Kombinierte Verfahren

### 3.2.1 Duale Detektion

Nach der Optimierung der Einzeltests wurden je zwei Primerpaare und Sonden zum Nachweis zweier verschiedener Erreger zusammengelegt und in einer Nachweisreaktion kombiniert. Das geschah zur Einsparung von Reagenzien und ggf. auch Patientenmaterial sowie zur Verkürzung der Bearbeitungszeit. Das Gesamtvolumen wurde auf 35 µl erhöht, um von Präparationen des Patientenmaterials, insb. bei Liquor und Gewebe, ausreichend große Volumina einsetzen zu können (bis zu 6 µl).

Die Kombination der DNA-Nachweise für *C. pneumoniae* und *M. pneumoniae* erwies sich als gut durchführbar. Da es nur zu einem geringen, tolerierbaren Sensitivitätsverlust von maximal einer Verdünnungsstufe im Messgrenzbereich kam, wurden analog die Nachweise für *Legionella* spp. und *L. pneumophila* unter Verwendung desselben Primerpaars 5'-Primer LG\_5A/3'-Primer LG\_II3 zusammengelegt.



Dargestellt ist die Fluoreszenzstärke  $\Delta R_n$  in Abhängigkeit von der Zyklenzahl eines Versuchs mit jeweils 6  $\mu$ l rekombinanter Plasmid-DNA mit *C.-pneumoniae*- und *M.-pneumoniae*-Zielsequenzen in den Konzentrationen 1.000, 10 und 1  $\text{fg}/\mu\text{l}$ .

Es ist deutlich zu erkennen, dass das FAM-Fluoreszenzsignal im Verlauf der Amplifikation generell ein deutlich höheres Niveau als das von YY erreichte. Der  $C_t$ -Wert für die jeweilige Ziel-DNA-Konzentration (Kreis) war jedoch identisch.

#### Abbildung 14: Duale Detektion am Beispiel von Verdünnungsreihen

Ursprünglich sollte der MTK-Nachweis mit  $\beta$ -Globin gekoppelt werden (vgl. Abbildung 7). War jedoch die DNA-Konzentration einer der beiden Genarten sehr viel höher als die der anderen ( $\geq 1:100$ ), wurde das schwächere Signal maskiert. Aufgrund eines erwartungsgemäß stets mäßig bis hohem  $\beta$ -Globin-Signals war ein Sensitivitätsverlust für den Tuberkulosenachweis zu befürchten, was angesichts der klinischen Relevanz der Tuberkulose nicht akzeptabel war. Schließlich erwies sich auch aufgrund der unterschiedlichen Häufigkeit der Anforderung beider Nachweise durch die Einsendung bzw. das eigene Labor die getrennte Etablierung als sinnvoll. Der beschriebene Maskierungseffekt trat auch im Chlamydien-Mykoplasmen-System auf. Da die Spezifität positiver Proben jedoch immer mittels Sequenzierung überprüft wurde, konnten Doppelinfektionen schnell erkannt werden. Bei einer etwa gleich hohen Konzentration beider Erreger waren RT-Darstellung und -Analyse des RT-PCR-Verlaufs gut nachvollziehbar. Dies galt auch bei sehr hohen Konzentrationen.

Bei Legionellen kann eine mögliche parallele Gegenwart von *L. pneumophila* und Non-*pneumophila*-Legionellen in einer Probe vor der Sequenzierung anhand der stärkeren Fluoreszenz der YY-Sonde unterschieden werden, so dass die Maskierung hier keine Rolle spielte.



Eine Kombination von mehr als zwei Nachweisverfahren in einem Gefäß erwies sich aufgrund zu starker Sensitivitätsverluste als nicht sinnvoll. Eine weitere Koppelung der Nachweise erfordert zudem zur simultanen Visualisierung der Fluoreszenzsignale ein Vierkanalgerät, welches zu Beginn der Experimente nicht zur Verfügung stand.

### 3.2.2 Zeitaufwand

Auf einer 96-Kavitäten-Platte konnten maximal 20 Patientenproben inkl. Kontrollen bei sechs zu unterscheidenden Parametern oder 87 Einzelnachweise eines Parameters (inkl. Positiv-/Negativkontrollen mit Standardkurven) untersucht werden. Etwa eine Stunde musste für die DNA-Extraktion und -Präparation kalkuliert werden, weitere 30–50 min für die Vorbereitung des Reaktionsansatzes inkl. Kontrollen. Etwa 2–5 min beanspruchten außerdem die Programmierung und Initiierung des Gerätes, die Eingaben über die Plattenbelegung nahmen weitere 5–10 min in Anspruch, konnten aber während des Gerätelaufs zeitsparend durchgeführt werden. Die RT-PCR selbst dauert genau 75 min inkl. der Generierung von Standardkurven. Bei einem integrierten Two-Step-Stage (vgl. 2.4.4) verkürzt sich der PCR-Lauf auf 56 min. Eine Verlängerung der Zyklendauer in der Elongationsphase auf 60 s oder eine Erhöhung der Zyklenanzahl auf 45 Zyklen erbrachten keine Veränderung des  $C_t$ -Werts oder der Signalstärke.

### 3.2.3 Besonderheiten beim Nachweis von Legionellen

Der Nachweis von Legionellen-DNA gestaltete sich am schwierigsten.

Das Konzept sah die Replikation eines gemeinsamen Amplikons für alle *Legionella* spp. vor mit jeweils einzelnen sensitiven Sonden für alle *Legionella* spp. und *L. pneumophila*.

Das zunächst verwendete Primerpaar von Jonas. et. al., 1995 [121] erwies sich als wenig sensitiv. Der 5'-Primer LG\_5A lag dabei auf Position 451–463 und der 3'-Primer LG\_3A auf Position 817–836 des 16S rDNA-Gens (Abbildung 15).

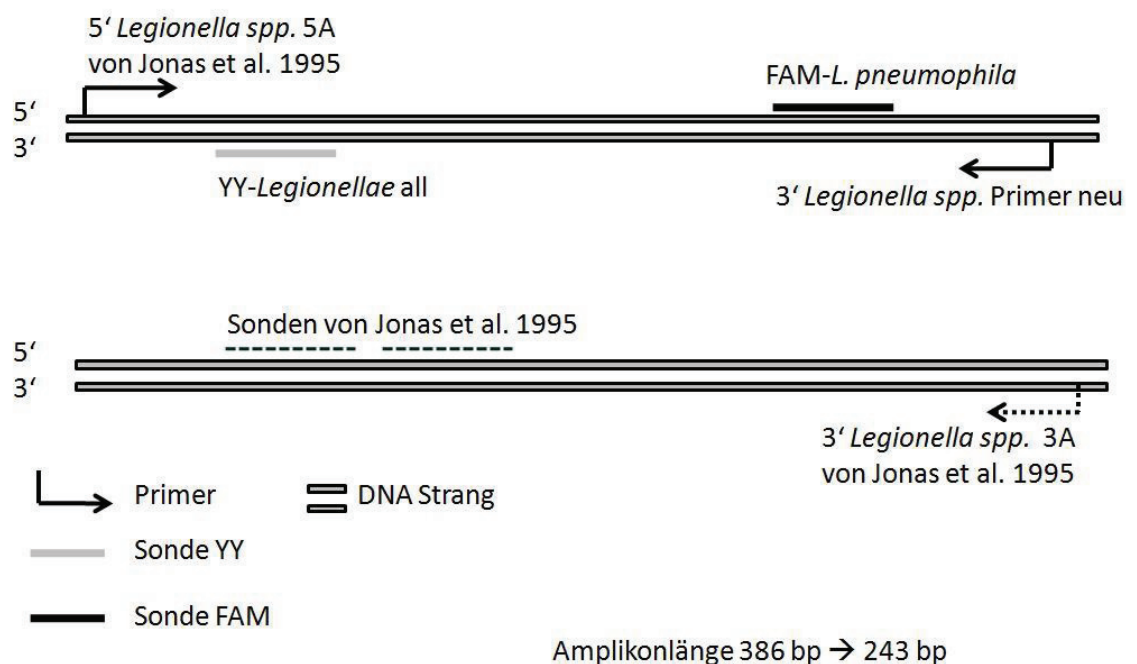
Zur Optimierung wurden daraufhin die beiden Primerpaare LP\_3 auf der Position 597–623 und LG\_5 auf der Position 734–708 entwickelt, die das 386-bp-große Amplikon teilten und zusammen mit den alten Primern zur Produktion zweier



verschiedener, nachweisspezifischer Amplikons führten. Das eine, 172 bp-große Amplikon war dabei hochspezifisch für *L. pneumophila*, während das andere, 128 bp-große Amplikon von allen Legionellen-Stämmen zu generieren war. Außerdem wurde die Sondenposition an einen anderen Genabschnitt verlagert, um nicht mit den Primern zu interagieren.

In den folgenden Experimenten erkannte die *Legionella*-species-Sonde jedoch auch die DNA einiger Non-Fermenter-Bakterienstämme wie *Acinetobacter* und *Actinomyces*, was im Wesentlichen auf die mangelnde Spezifität des von Jonas et al. publizierten 3'-Primer und der neuen Sonde zurückzuführen war. Dieser Sachverhalt konnte weder mit der Entwicklung zweier weiterer Primer unter Vergrößerung der jeweiligen Amplikongröße noch durch die Verlängerung der Sonden zur Spezifitätserhöhung gelöst werden.

Zuletzt führte die Verkürzung des Amplikons auf 243 bp mit einem neuen, nur Legionella spezifischen Primer 3'-Primer auf Position 694–672 unter Beibehalt des von Jonas et al. publizierten 5'-Primers zu einem ausgesprochen sensitiven, hochspezifischen sowie theoretisch und experimentell kreuzreaktionsfreien Nachweisverfahren. Schematisch sind die verschiedenen Schritte in der Abbildung 15 nachvollziehbar.



**Abbildung 15: Schema der verwendeten Sonden und Primer beim Legionellen-Nachweis**

Die Amplikon-Verkürzung erforderte die Generierung von zwei neuen Sonden: der *L. pneumophila* spezifischen bzw. der alle Legionellenarten erkennenden Sonden. Wegen der hohen Spezifität der Legionellenarten erkennenden Sonde konnten allerdings theoretisch die zwei Legionellen-Spezies *L. steigerwaltii* und *L. cherii* nur unzureichend oder gar nicht mehr erkannt werden. So weisen die 16S-rDNA-Sequenzen beider Stämme je ein Mismatch im Bindungsbereich der Sonde auf, während alle anderen *Legionella* spp. im Sondenbereich sequenzidentisch waren. Diese Varianz konnte zu einer ineffizienten oder ungenügenden Bindung der TaqMan-Sonde führen. In den entsprechenden Experimenten jedoch war die Detektion uneingeschränkt bis zu Verdünnungen von ca. 60 fg/μl Erreger-DNA möglich. Für den medizinischen Laboralltag ist dieses Ergebnis allerdings weniger relevant, da beide Spezies bisher nicht im Zusammenhang mit Erkrankungen des Menschen beschrieben wurden.

Die eindeutige Detektion von *L. pneumophila* erfolgte mittels der speziesspezifischen Sonde. Andere Legionellen-Spezies wiesen im Sondenbindenden Genomabschnitt mindestens 3–4 Mismatches auf, und die experimentelle Testung fiel analog negativ aus.

Die in Tabelle 7 aufgelisteten Bakterienspezies wurden bei der Spezifitätsmessung der Legionellen-PCR bzw. Sondendetektion des Legionellen-PCR-Amplikats verwendet; weitere getestete Spezies werden in Tabelle 13 dargestellt.

Spezies	Herkunft des Bakterienstamms
1. <i>Legionella adelaidensis</i> Serogruppe 1	Sammlung TU Dresden
2. <i>Legionella anisa</i>	Wasserprobe Uni Rostock
3. <i>Legionella birminghamensis</i> Serogruppe 1	Sammlung TU Dresden
4. <i>Legionella bozemanii</i> Serogruppe 1	Sammlung TU Dresden
5. <i>Legionella bozemanii</i> Serogruppe 2	Sammlung TU Dresden
6. <i>Legionella cherii</i>	Stammsammlungsisolat (ATCC 35252)
7. <i>Legionella cherii</i>	Sammlung Uni Rostock
8. <i>Legionella felii</i>	Sammlung TU Dresden
9. <i>Legionella jamestown</i>	Sammlung TU Dresden
10. <i>Legionella jordanis</i>	Sammlung Uni Rostock
11. <i>Legionella micdadei</i> Serogruppe 1	Sammlung TU Dresden
12. <i>Legionella/Tatlockia micdadei</i>	Stammsammlungsisolat (ATCC 33218)
13. <i>Legionella micdadei</i>	Sammlung Uni Rostock
14. <i>Legionella pneumophila</i> Serogruppe 1	Stammsammlungsisolat (ATCC 33152)
15. <i>Legionella pneumophila</i> Serogruppe 2	Patientenisolat
16. <i>Legionella pneumophila</i>	Sammlung TU Dresden
17. <i>Legionella rubrilucens</i>	Wasserprobe Uni Rostock
18. <i>Legionella steigerwaltii</i>	Stammsammlungsisolat (ATCC 35302)
19. <i>Alcaligenes faecalis</i>	Patientenisolat
20. <i>Acinetobacter baumannii</i>	Stammsammlungsisolat (DSM 30008)
21. <i>Acinetobacter lwoffii</i>	Sammlung Uni Rostock
22. <i>Actinomyces meyeri</i>	Sammlung Uni Rostock
23. <i>Actinomyces neuii</i>	Sammlung Uni Rostock
24. <i>Actinomyces urogenitalis</i>	Sammlung Uni Rostock
25. <i>Burkholderia cepacia</i>	Sammlung Uni Rostock
26. <i>Burkholderia gladioli</i>	Sammlung Uni Rostock
27. <i>Norcardia abscessus</i>	Sammlung Uni Rostock
28. <i>Norcardia farcinica</i>	Sammlung Uni Rostock
29. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Stammsammlungsisolat (ATCC 9027)
30. <i>Pseudomonas fluorescense</i>	Sammlung Uni Rostock
31. <i>Pseudomonas luteola</i>	Sammlung Uni Rostock
32. <i>Flavimonas oryzae</i>	Sammlung Uni Rostock
33. <i>Pseudomonas putida</i>	Sammlung Uni Rostock
34. <i>Pseudomonas stutzeri</i>	Sammlung Uni Rostock
35. <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Sammlung Uni Rostock
36. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Stammsammlungsisolat (ATCC 13637)

**Tabelle 7: Legionellen und nah verwandte Bakterienarten**

### 3.3 Analyse von Patientenmaterial

Die hier vorgestellten RT-PCR-Nachweisverfahren wurden als qualitative und begrenzt quantitative Methoden für die Routinediagnostik konzipiert und optimiert. Die Testung klinischer Proben stellte daher einen maßgeblichen Teil der Arbeit dar. Da einige der untersuchten Erreger im stationären Bereich einer Klinik ausgesprochen selten nachgewiesen werden, dienten als Positivkontrollen in erster Linie mit Referenz-DNA versetzte, zuvor negativ getestete Patientenproben. Auch die interne Validierung (s. u.) wurde mit solchen „modifizierten“ Proben durchgeführt. Die Anzahl der tatsächlich die spezifischen Erreger enthaltenden Patientenproben beschränkt sich bei *M. tuberculosis* auf 70 Proben, bei *M. pneumoniae* auf vier, bei *L. pneumophila* und entsprechend bei allen *Legionella* spp. auf vier. *Chlamydophila*-positive Patientenproben waren die einzigen Patientenproben, die nicht zugänglich waren. Es war nicht möglich, von anderen Instituten entsprechendes Patientenmaterial zu erhalten.

### 3.4 Externe und interne Validierung

Das Validierungsprogramm gliederte sich in einen externen und einen internen Part. Extern erfolgte die Qualitätskontrolle durch die Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e. V. (INSTAND) durch sogenannte Ringversuchsproben. Dabei wurden alle hier entwickelten Nachweise jeweils im Winter und Sommer in den Jahren 2007–2009 geprüft und führten in jedem Fall zu einem richtigen Ergebnis.

Intern entwickelte Nachweisverfahren auf der Basis wissenschaftlicher Ergebnisse gelten als sogenannte In-House-Tests. Entsprechend ist das Labor selbst für die Eignung der Methodik verantwortlich. In diesem Rahmen findet dann die Prüfung der Präzision und Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und Kreuzreaktion und Reproduzierbarkeit statt. Ein standardisiertes Vorgehen war dabei unerlässlich.

Die Nachweise wurden im internen Validierungsprozess zur Akkreditierung in Anlehnung an Protokolle von Rabenau et al. [123, 124] getestet. Seine ursprünglich für die Virusdiagnostik entwickelten Anforderungen an qualitative und quantifizierende molekularbiologische Verfahren lassen sich auch auf Nachweise für

Bakterien übertragen. Entsprechend der DIN EN ISO 15189 erfolgte die Validierung für jedes einzelne Untersuchungsverfahren, also hier jedes Mono- bzw. Duplex-System.

### **3.4.1 Analytische Sensitivität und Spezifität**

Die interne Prüfung erfolgte auf der Grundlage der Validierungsanleitung für qualitative In-House-Tests von Rabenau et al. So erfolgte die Messung der Sensitivität anhand von mindestens zehn bekannt positiven und mindestens 10 bekannt schwach positiven bzw. grenzwertigen Proben. Zur Überprüfung der Spezifität gehörte die Testung von mindestens 20 bekannt negativen Proben inklusive potentiell kreuzreaktiver Analyte.

Entsprechend wurde für jeden der folgenden Nachweise a) MTK-Komplex, b) *C. pneumoniae* – *M. pneumoniae*, c) *Legionella* spp. – *L. pneumophila* die geforderte Anzahl an Proben getestet, bei b) und c) jeweils 40 negative Proben. Zur Gewährung kontinuierlich grenzwertiger Proben wurden auch hier mit Referenzstamm-DNA versehene negative Patientenproben verwendet.

Bei der Berechnung der Sensitivität und Spezifität wurden außerdem während der Entwicklung der Nachweise getestete bekannte Proben berücksichtigt, um einen bestmöglichen Überblick mit repräsentativ großen Zahlen zu gewährleisten.

Der von Rabenau geforderte Methodenvergleich von mindestens 7 positiven, 7 negativen und 6 grenzwertigen Proben wurde integriert und zahlenmäßig deutlich erweitert (s. u.).

Für den Nachweis von MTK-Bakterien stand mit der Kultur als Goldstandard die maßgebliche Detektionstechnik zur Verfügung. Von allen 966 Patientenproben wurden parallel zum Nukleinsäurenachweis Mykobakterien-Kulturen angelegt.

Von 101 RT-PCR-positiven Proben konnten 96 mittels Kultur direkt verifiziert werden. Dabei ist herauszustellen, dass der Nukleinsäurenachweis auch Genomabschnitte von phagozytierten, nicht vermehrungsfähigen oder toten Mykobakterien erfasst. Dieses Phänomen erschwerte die Interpretation des Nukleinsäurenachweises besonders bei Patienten mit lange zurück liegenden Tuberkulose-Erkrankungen (vgl. 4.).

Die Aufreinigung aller Mykobakterien-verdächtigter Proben fand in denselben Räumlichkeiten im TB-S3-Labor statt. Trotz aller Vorsichtsmaßnahmen war daher auch die Kontamination negativer Proben durch die parallele Durchführung nicht vollkommen auszuschließen und kann als weitere Erklärung für die NAT-positiven und im Kulturverfahren negativen Patientenproben dienen.

Für den Nachweis von *C.-pneumoniae*- und *M.-pneumoniae*-DNA wurden alle mit rekombinanten Plasmiden versetzten Patientenproben mit der RT-PCR und einem zuvor etablierten Nested-PCR-Verfahren (nach Tong et al. [119] bzw. Talkington et al. [120]) verglichen. Dabei waren die Ergebnisse aller Proben bei beiden Verfahren für beide Erreger-DNA-Nachweise identisch.

Das vergleichende Verfahren für Legionellen orientierte sich an der Publikation von Jonas et al [121] mit anschließender Überprüfung im Elektrophoresegel. Im Nachweis von Legionellen-DNA war eine Patientenprobe RT-PCR negativ aber DEIA-positiv; die Sequenzierung ergab den Nachweis von *L. pneumophila*. Hier bestand bei fehlender Klinik des Patienten bei einer breitpositiven Bande im Elektrophoresegel der dringliche Verdacht auf eine Kontamination im Verlauf der Probenverarbeitung.

Erreger-nachweis	Tatsächlicher Sachverhalt (alle Proben) positiv negativ		Vergleichsmethode	Sensitivität in %	Spezifität in %	PPV	NPV
<b><i>M. tuberculosis</i></b>			Kultur	100	99,4	0,97	1,0
Test positiv	96	5					
Test negativ	0	865					
<b><i>C. pneumoniae</i></b>			Nested-PCR [119]	100	100	1,0	1,0
Test positiv	28	0					
Test negativ	0	238					
<b><i>M. pneumoniae</i></b>			Nested-PCR [120]	100	100	1,0	1,0
Test positiv	39	0					
Test negativ	0	242					
<b><i>Legionella spp.</i></b>			DEIA [121]	97,9	99,6	0,99	0,99
Test positiv	91	1					
Test negativ	2	278					
<b><i>L. pneumophila</i></b>			DEIA [121]	95,6	99,7	0,98	0,99
Test positiv	43	1					
Test negativ	2	313					

**Tabelle 8: Sensitivität und Spezifität**

Alle drei Legionella-RT-PCR vermutlich falsch detektierten Proben gehörten zu klinisch unauffälligen Patienten. Da kein alternatives Nachweisverfahren zur Verfügung stand, war der korrekte Sachverhalt nicht zu ermitteln.

Tabelle 8 fasst die Versuchsergebnisse der Sensitivitäts- und Spezifitätsmessungen zusammen. In die Werte gingen alle Untersuchungen mit „modifizierten“ Patientenmaterialien, echten Patientenproben, Materialien aus Ringversuchen und Kulturmateriale von Stammsammlungsisolaten mit ein. Die Angaben spiegeln die erwarteten Ergebnisse wider, nur in Ausnahmefällen kam es zu falsch positiven oder falsch negativen Testungen.

### 3.4.2 Detektionsgrenzen

Ein weiterer wichtiger Baustein bei der Validierung war die Testung der Nachweisgrenze. Hierzu wurde die definieren Proben der Verdünnungsreihen von 0,1 fg/μl bis 1 ng/μl verwendet (vgl. 2.1, S. 31). In mehrfacher Wiederholung wurde diejenige Probe bestimmt, bei der konstant noch ein  $C_t \leq 38$  Zyklen zu finden war. Die Festlegung von  $C_t$  38 war eine subjektive Festlegung, die sich im Verlauf als gutes Qualitätskriterium erwies.

Die Nachweisgrenze der RT-PCR für MTK-Bakterien von rekombinanter Plasmid-DNA lag bei 0,6–6 fg, was äquivalent zum Nachweis von ca. 1–60 Mykobakterien pro Reaktion (1–60 GE) war. Abhängig von der Subspezies liegt das Insertionselement *IS6110* im Genom von *M. tuberculosis*-Stämmen variabel in 1–20 Kopien vor, während *M. bovis*-Stämme nur 1–3 Kopien besitzen [112–115]. Die Sensitivität für den Nachweis von  $\beta$ -Globin liegt bei ca. 80 Kopien und entspricht ca. 40 humanen Zellen.

Bei der gekoppelten Nachweisreaktion für *C. pneumoniae*- und *M. pneumoniae*-DNA lag das Detektionslimit jeweils bei 0,6–6 fg. Für Mykoplasmen ist dies äquivalent zu ca. 10 Bakterien und erreicht damit nahezu dieselbe Sensitivität wie publizierte Nested-PCR-Protokolle [125]. Das Ziel-Gen für den Legionellen-Nachweis, das 16S-rDNA-Gen, lag bei diesen Bakterien in sechs bis acht Kopien pro Genom vor. Damit entsprach eine detektierbare Kopienzahl von 60–600 dem Nachweis von 10–100 Organismen pro Reaktion (Tabelle 9).

	MTK	$\beta$ -Globin	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Legionella</i> spp.	<i>Legionella pneumophila</i>
Plasmid DNA in fg	0,6	0,6–6	0,6–6	0,6–6	0,6–6	0,6–6
Chrom. DNA in fg	–	–	60	60	60	60
Kopienzahl	6–60	80	60–600	60	60–600	60–600
Anzahl an Organismen	1–60	40 Zellen	60–600	60	10–100	10–100

**Tabelle 9: Nachweisgrenzen der spezifischen RT-PCR**

Bei der Untersuchung von DNA aus verschiedenen Legionellen-Spezies, die uns freundlicherweise vom Konsiliarlabor zugestellt worden waren, zeigten sich trotz photometrisch kontrollierter Verdünnung gleicher Konzentration deutlich unterschiedliche  $C_t$ -Werte (Tabelle 10).

Stamm	$C_t$	Entsprechende errechnete Kopienzahl
<i>L. birminghamensis</i> serogroup 1 1 ng	16,85	9.363.513
<i>L. bozemanii</i> serogroup 1 1 ng	19,25	2.357.340
<i>L. bozemanii</i> serogroup 2 1 ng	21,33	713.130
<i>L. jamestown</i> serogroup 1 1 ng	29,80	5.467
<i>L. pneumophila</i> serogroup 1 1 ng	24,71	102.382
<i>L. felii</i> serogroup 1 1 ng	25,42	67.667
<i>L. pneumophila</i> Referenzplasmid-DNA 1 pg $\approx$ 1 ng chromosomaler DNA	23,93	160.000

**Tabelle 10: Testung von sechs *Legionella*-Spezies mit photometrisch gleichem DNA-Gehalt**

Dargestellt ist das Ergebnis von sechs Legionellen-Stämmen, die photometrisch (Picodrop, Picodrop Limited, Saffron Walden, UK) gleiche DNA-Mengen aufwiesen, im Amplifikations-Verhalten und damit der errechneten Kopienzahl jedoch erheblich variieren. Die angegebenen  $C_t$ -Werte beziehen sich dabei auf den YY-Kanal, um die Vergleichbarkeit mit *L. pneumophila*-Stämmen zu gewährleisten. Die angegebenen Kopienzahlen wurden vom StepOnePlus-Instrument berechnet.

Als Gründe für die Abweichungen kommen DNA-Strangbrüche durch lange Aufbewahrungszeiten oder Transport sowie eine unterschiedlich hohe Kopienzahl der rDNA-Genkomplexe im Genom der verschiedenen Stämme in Frage. Allerdings



trat dieser Sachverhalt bei im Institut aus Bakterienkulturen isolierten Stämmen von *L. anisa*, *L. rubrilucens* und *L. pneumophila* nicht auf. Hier korrelierten die photometrischen Messungen mit den entsprechenden  $C_t$ -Werten.

Für identische DNA-Konzentrationen lagen die Nachweisgrenzen für chromosomale DNA aller unterschiedlichen Bakterienarten um den Faktor 100–1000 über denen für rekombinante Plasmid-DNA. Diese Beobachtung deckt sich mit der Tatsache, dass das chromosomale Genom ca. um den Faktor 1000 komplexer ist als das rekombinante Plasmid (4 kb zu 3,6 mbp).

### **3.4.3 Präzision, Richtigkeit, Linearität**

Entsprechend der Vorgaben von Rabenau et al. [123] erfolgte auch die Testung auf Präzision, Richtigkeit und Linearität für jeden Nachweis. Dabei wurden jeweils mindestens eine negative, eine schwach-positive und eine positive Proben am selben Tag in Dreifachbestimmung (Intraassay) sowie an zwei darauf folgenden Tagen einfach in Einfachbestimmung durchgeführt (Interassay).

Die Untersuchung der Linearität überprüft die Reproduzierbarkeit der Verdünnungsreihen, die eine Schlüsselrolle als Vergleichsstandard während der gesamten Etablierung dieser Arbeit spielten.

Dabei wurden entsprechend der Validierungsforderungen Verdünnungsreihen mit je drei Proben in 1:10-Verdünnung in Doppelbestimmungen an zwei aufeinander folgenden Tagen untersucht.

Die Tabelle 11 stellt zusammenfassend die Ergebnisse der  $C_t$ -Werte der Präzisions- und Richtigkeitsmessung sowie der Linearitätsprüfung nach Rabenau unter Angabe von Mittelwert und Standardabweichung für jeden Nukleinsäurenachweis dar. Da die Ergebnisse für beide Validierungsparameter nahezu identisch waren, wurde an dieser Stelle auf eine geteilte Darstellung verzichtet.

Aus den Daten der Tabelle wird deutlich, dass je nach nachzuweisender Nukleinsäure Unterschiede innerhalb eines (Intra-) und zwischen verschiedenen (Inter-)Tests (Assays) auftreten können. So waren Schwankungen zwischen 0,1 und 1,85 Zyklen möglich. In der Bilanz jedoch verhielten sich die Mittelwertabweichungen in der Gesamtberechnung von Intra- und Interassay fast gleich und waren mit durchschnittlich 0,27 Zyklen minimal. Diese Aussage gilt auch

für die Korrelationskoeffizienten der Verdünnungsreihen. Im Einzelfall betrug die Streuung 0,9–10,6 %, im Schnitt waren es 5,9 %. Die Untersuchung zeigt, dass die Nachweise den Anforderungen gut gerecht werden.

	MTK	B-Globin	<i>C. pneumoniae</i>	<i>M. pneumoniae</i>	<i>Legionella</i> spp.	<i>L. pneumophila</i>	Ø
<b>Intraassay</b>							
in Zyklen							
Mittelwert Probe 1	19,08	–	15,07	27,24	32,58	32,69	–
Standardabweichung Probe 1	0,26	–	0,1	0,23	0,99	0,05	0,33
Mittelwert Probe 2	23,12	–	24,83	31,17	24,41	24,43	–
Standardabweichung Probe 2	0,02	–	1,23	0,22	0,4	0,56	0,41
<b>Interassay</b>							
in Zyklen							
Standardabweichung Probe 1	0,11	–	0,3	0,45	0,44	1,85	0,63
Standardabweichung Probe 2	0,32	–	0,18	0,58	0,2	0,3	0,47
<b>Gesamtbetrachtung</b>							
In Zyklen		–					
Mittelwert Probe 1	18,99	–	15,08	26,91	32,33	33,53	–
Standardabweichung Probe 1	0,23	–	0,24	0,39	0,82	1,34	0,60
Mittelwert Probe 2	23,07	–	24,77	30,96	24,32	24,37	–
Standardabweichung Probe 2	0,21	–	0,82	0,45	0,35	0,51	0,27
Korrelationskoeffizient Intraassay	0,91	0,89	0,95	0,98	0,99	0,97	0,95
Korrelationskoeffizient Interassay	0,91	0,93	0,91	0,95	0,93	0,96	0,93

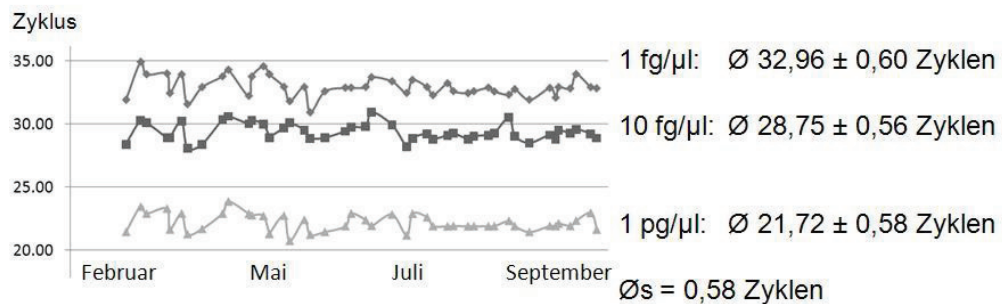
**Tabelle 11: Bestimmung der Präzision der verschiedenen Nukleinsäurenachweise**

Bei der Interpretation gilt zu berücksichtigen, dass die Probenmenge von jeweils drei Proben pro Erreger in insgesamt fünf Messungen nur ein verhältnismäßig kleines Kollektiv widerspiegelte.

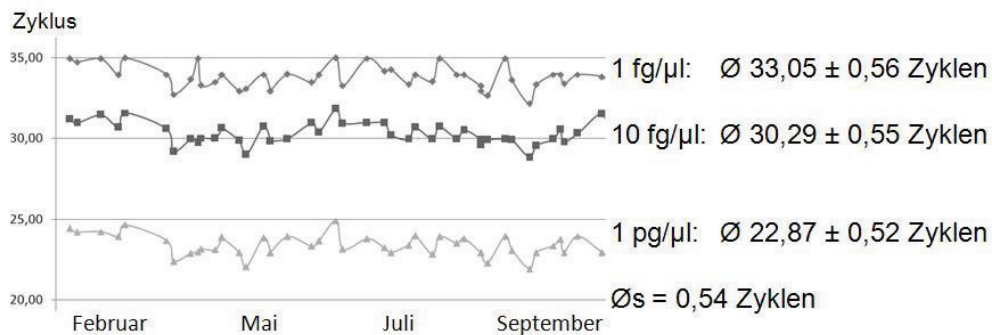
Um die Beurteilung der Linearität zu objektivieren, wurden deshalb exemplarisch die  $C_t$ -Werte der drei Positivkontrollen von Verdünnungsreihen aus der Routinediagnostik für die Nachweise von *C. pneumoniae*-DNA und *M. pneumoniae*-DNA über den Zeitraum von sechs Monaten verfolgt. Für beide Erregerarten wurden dabei mit rekombinanter Plasmid-DNA versetzte Patientenproben mit der

DNA-Menge von je 1 pg, 10 fg und 1 fg eingesetzt und damit deutlich positive und grenzwertig positive Proben untersucht. Berücksichtigt wurden dabei je 135 Wertepaare. Beispielhaft zeigt Abbildung 16 den Kurvenverlauf. Die Standardabweichungen betrugen im Mittel 0,58 bzw. 0,54 Zyklen (1,69–2,67 %) und waren damit als gering zu bewerten (Referenzwert 15–30 % [124]).

### *Chlamydomophila pneumoniae*



### *Mycoplasma pneumoniae*



**Abbildung 16: Darstellung der Linearität am Beispiel von *C. pneumoniae* und *M. pneumoniae* über den Zeitraum von sechs Monaten**

### 3.4.4 Kreuzreaktionen mit der DNA anderer Bakterien

Für die Überprüfung der Kreuzreaktivität außer in geringem Umfang über die Spezifität finden sich in Rabenaus Vorgaben keine definierten Qualitätsgrößen. So wurden in dieser Arbeit extrahierte DNA-Proben von mehr als 70 humanpathogenen Keimen getestet, welche teils mit den nachzuweisenden Erregern phylogenetisch verwandt sind, teils den Respirationstrakt besiedeln und daher durch Kreuzreaktionen oder ggf. unspezifische Bindung ein Problem darstellen konnten.

Alle extrahierten DNA-Proben wurden zuvor mit einem 16S-DNA-PCR-Protokoll auf das Vorliegen amplifizierbarer bakterieller DNA getestet und die entstandenen Amplikons durch Sequenzierung auf Übereinstimmung mit dem eingesetzten Bakterium geprüft. Damit war gewährleistet, dass tatsächlich die zu testende DNA in jeweils ausreichenden Mengen in den Tests eingesetzt wurde.

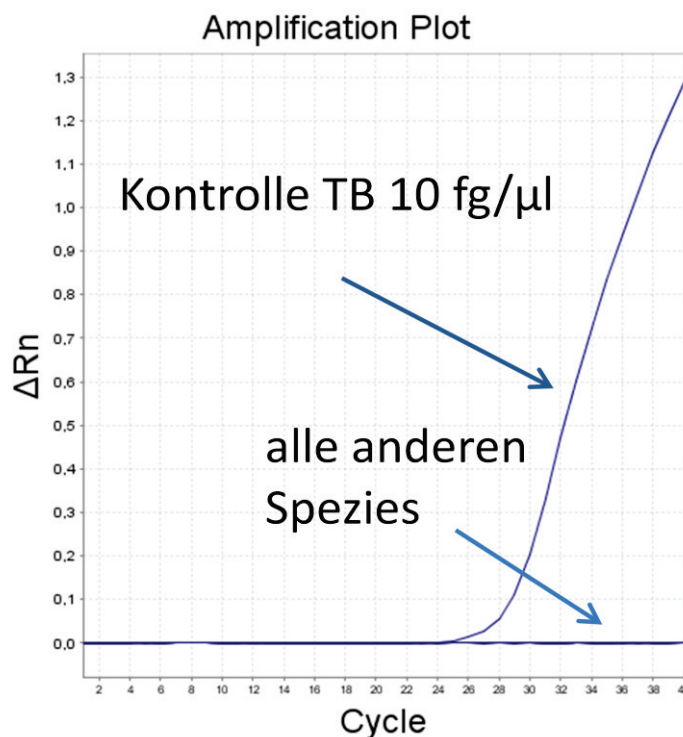
Alle Originalmaterialien von getesteten MOTT-Patienten waren in der MTK-RT-PCR negativ. Von den zwölf aus dem Mykobakterien-Referenzlabor Borstel bezogenen MOTT-Bakterienstämmen war ein Stamm MTK-RT-PCR-positiv und ein weiterer schwach-positiv. Ersterer erwies sich in der 16S rDNA-Sequenzierung als dem *M. tuberculosis*-Komplex zugehörig und wurde damit als Kontamination gedeutet. Bei der zweiten, schwach-positiven Probe war die 16S rDNA-Sequenzierung nicht erfolgreich; auch hier ist eine Kontamination ggf. durch Amplifikate wahrscheinlich. Die sieben ATCC-spezifizierten MOTT-Stämme aus Borstel waren alle korrekt negativ.

Spezies	Identifikation
1. <i>Mycobacterium abscessus</i>	ATCC 7421
2. <i>Mycobacterium avium</i>	Patientenisolat
3. <i>Mycobacterium avium-complex</i>	Patientenisolat
4. <i>Mycobacterium chelonae</i>	ATCC 7472
5. <i>Mycobacterium chelonae/abscessus</i>	Patientenisolat
6. <i>Mycobacterium fortuitum</i>	ATCC 6841
7. <i>Mycobacterium fortuitum</i>	Patientenisolat
8. <i>Mycobacterium gastri</i>	Sammlung Uni Rostock
9. <i>Mycobacterium goodii</i>	Patientenisolat
10. <i>Mycobacterium intracellulare</i>	ATCC 8397
11. <i>Mycobacterium kansasii</i>	ATCC 7646
12. <i>Mycobacterium kansasii</i>	Sammlung Uni Rostock
13. <i>Mycobacterium malmoense</i>	Patientenisolat
14. <i>Mycobacterium porcinum</i>	Sammlung Uni Rostock
15. <i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	ATCC 3269
16. <i>Mycobacterium septicum</i>	Patientenisolat
17. <i>Mycobacterium simiae</i>	Sammlung Uni Rostock
18. <i>Mycobacterium szulgai</i>	Sammlung Uni Rostock
19. <i>Mycobacterium xenopi</i>	Patientenisolat
20. <i>Mycobacterium xenopi</i>	ATCC 7365
21. <i>Actinomyces meyeri</i>	Sammlung Uni Rostock
22. <i>Actinomyces neuii</i>	Sammlung Uni Rostock
23. <i>Actinomyces urogenitalis</i>	Sammlung Uni Rostock
24. <i>Norcardia abscessus</i>	Sammlung Uni Rostock
25. <i>Norcardia farcinica</i>	Sammlung Uni Rostock

**Tabelle 12: MOTT und Mykobakterien-ähnliche Stämme**

Außerdem wurden als nahe Verwandte einige Nokardien und Aktinomyzeten erwartungsgemäß erfolgreich negativ getestet. Somit zeigte sich der MTK-DNA-Nachweis nahezu kreuzreaktionsfrei. Die Tabelle 12 zeigt eine Auflistung der untersuchten Bakterienstämme, die im MTK-DNA-Nachweis untersucht wurden.

Abbildung 17 stellt das Amplifikationsprofil eines Versuchs mit sechs verschiedenen MOTT-Stämmen dar. Das einzige Fluoreszenzsignal ( $C_t$  27) geht von der Positivkontrolle mit *M. tuberculosis* aus.



**Abbildung 17: Kreuzreaktionstestung vom MTK-Nachweis**

Dargestellt ist der Amplifikationsverlauf eines Experiments, bei dem verschiedene MOTT-Stämme und eine Probe mit *M. tuberculosis*-DNA in definierter Menge untersucht wurden. Aus der Abbildung geht hervor, dass es ausschließlich bei der TB-haltigen Probe zu einem die Basislinie verlassenden Fluoreszenzsignal kommt. Eine erfolgreiche Amplifikation kam also nur hier zustande.

*Quelle: Darstellung unter Verwendung der StepOnePlus-Software*

Für die Bewertung der *C. pneumoniae*-RT-PCR wurde innerhalb der Familie der *Chlamydiaceae* die Kreuzreaktivität mit den humanpathogenen Spezies *C. psittaci* und *C. trachomatis* ausgeschlossen. Dazu wurde natives und modifiziertes Patientenmaterial mit sechs verschiedenen Stämmen aus der Stammsammlung der Universität Ulm verwendet.

Für die Bewertung der *M.-pneumoniae*-RT-PCR wurden aus der Familie der *Mycoplasmataceae* verschiedene Proben mit *M.-hominis*-, *M.-genitalium*-, *M.-hyorhinae*- und *Ureaplasma- urealyticum*-DNA eingesetzt und nicht detektiert.

Alle Proben mit Legionellen-DNA wurden durch die Legionellen-Primer und die *Legionella-species*-Sonde erkannt. Ausschließlich Proben mit *L.-pneumophila*-DNA gaben ein FAM-positives Fluoreszenzsignal durch die Reaktion mit der *L.-pneumophila*-Sonde.

Zusammengefasst zeigten alle Nachweisverfahren fast ausschließlich eine Detektion derjenigen Nukleinsäure-Sequenzen, für die sie konzipiert waren. Trotz einer Fehlpaarung im Bindungsbereich der entsprechenden Sonde wurden *L. steigerwaltii* und *L. cherii* erkannt.

Spezies	Herkunft	RT-PCR-Nachweise					
		<i>M. tuberculosis</i>	<i>C. pneumoniae</i>	<i>M. pneumoniae</i>	<i>Legionella spp.</i>	<i>L. pneumophila</i>	16S-PCR
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Patientenisolat	–	–	–	–	–	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	DSM 30008	–	–	–	–	–	+
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Patientenisolat	–	–	–	–	–	+
<i>Actinomyces meyeri</i>	Patientenisolat	–	–	–	–	–	+
<i>Actinomyces neuui</i>	Patientenisolat	–	–	–	–	–	+
<i>Actinomyces urogenitalis</i>	Patientenisolat	–	–	–	–	–	+
<i>Bacillus thetaiotaomicron</i>	ATCC 29741	–	–	–	–	–	+
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285	–	–	–	–	–	+
<i>Burkholderia cepacia</i>	Patientenisolat	–	–	–	–	–	+
<i>Burkholderia gladioli</i>	Patientenisolat	–	–	–	–	–	+
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028	–	–	–	–	–	+
<i>Candida glabrata</i>	DSM 70164	–	–	–	–	–	+
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258	–	–	–	–	–	+
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019	–	–	–	–	–	+
<i>Candida tropicalis</i>	DSM 1346	–	–	–	–	–	+
<i>Chlamydomphila psittaci</i>	DC 5	–	–	–	–	–	+
<i>Chlamydomphila psittaci</i>	DC 35	n. t.	–	n. t.	n. t.	n. t.	+
<i>Chlamydia trachomatis</i>	DC 10 (D)	–	–	–	–	–	+
<i>Chlamydia trachomatis</i>	DC 38 (ASE)	–	–	–	n. t.	n. t.	+
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	DC9	–	+	–	–	–	+
<i>Chlamydomphila pneumoniae T183</i>	DSM 124	–	+	–	n. t.	n. t.	+
<i>Clostridium difficile</i>	DSM 1296	–	–	–	–	–	+
<i>Clostridium difficile</i>	Patientenisolat	–	–	–	–	–	+
<i>Clostridium sporogenes</i>	DSM 795	–	–	–	–	–	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	DSM 30053	–	–	–	–	–	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054	–	–	–	–	–	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	–	–	–	–	–	+
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 6057	–	–	–	–	–	+

Spezies	Herkunft	RT-PCR-Nachweise					
		<i>M. tuberculosis</i>	<i>C. pneumoniae</i>	<i>M. pneumoniae</i>	<i>Legionella</i> spp.	<i>L. pneumophila</i>	16S-PCR
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	–	–	–	–	–	+
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	DSM 20482	–	–	–	–	–	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49766	–	–	–	–	–	+
<i>Helicobacter pylori</i>	DSM 4867	–	–	–	–	–	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	–	–	–	–	–	+
<i>Legionella adelaidensis</i> S 1	Bakterienkultur	n. t.	n. t.	n. t.	+	–	+
<i>Legionella anisa</i>	Wasserprobe	n. t.	n. t.	n. t.	+	–	+
<i>Legionella birminghamensis</i> S1	Bakterienkultur	n. t.	n. t.	n. t.	+	–	+
<i>Legionella bozemanii</i> serogroup 1	Bakterienkultur	n. t.	n. t.	n. t.	+	–	+
<i>Legionella bozemanii</i> serogroup 2	Bakterienkultur	n. t.	n. t.	n. t.	+	–	+
<i>Legionella cherii</i>	ATCC 35252	n. t.	n. t.	n. t.	+	–	+
<i>Legionella cherii</i>	Bakterienkultur	n. t.	n. t.	n. t.	+	–	+
<i>Legionella cherii</i>	Bakterienkultur	n. t.	n. t.	n. t.	+	–	+
<i>Legionella felii</i>	Bakterienkultur	n. t.	n. t.	n. t.	+	–	+
<i>Legionella jamestown</i>	Bakterienkultur	n. t.	n. t.	n. t.	+	–	+
<i>Legionella jordanis</i>	Bakterienkultur	n. t.	n. t.	n. t.	+	–	+
<i>Legionella micdadei</i> S. 1	Bakterienkultur	n. t.	n. t.	n. t.	+	–	+
<i>Legionella/Tatlockia micdadei</i>	ATCC 33218	n. t.	n. t.	n. t.	+	–	+
<i>Legionella micdadei</i>	Bakterienkultur	n. t.	n. t.	n. t.	+	–	+
<i>Legionella micdadei</i>	Bakterienkultur	n. t.	n. t.	n. t.	+	–	+
<i>Legionella pneumophila</i> S. 1	ATCC 33152	n. t.	n. t.	n. t.	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> S. 2	Patientenisolat	n. t.	n. t.	n. t.	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i>	Bakterienkultur	–	–	–	+	+	+
<i>Legionella rubrilucens</i>	Wasserprobe	n. t.	n. t.	n. t.	+	–	+
<i>Legionella steigerwaltii</i>	ATCC 35302	n. t.	n. t.	n. t.	+	–	+
<i>Morganella morganii</i>	DSM 30064	–	–	–	–	–	+
<i>Mycobacterium abscessus</i>	ATCC 7421	–	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	+
<i>Mycobacterium avium</i>	Patientenisolat	–	–	–	–	–	+
<i>Mycobacterium avium-complex</i>	Patientenisolat	–	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	+
<i>Mycobacterium bovis</i>	Patientenisolat	+	–	–	–	–	+
<i>Mycobacterium chelonae</i>	ATCC 7472	–	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	+
<i>Mycobacterium chelonae/abscessus</i>	Patientenisolat	–	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	+
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	ATCC 6841	–	–	–	n. t.	n. t.	+
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Patientenisolat	–	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	+
<i>Mycobacterium gastrii</i>	Patientenisolat	–	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	+
<i>Mycobacterium gordonae</i>	Patientenisolat	–	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	+
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	ATCC 8397	–	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	+
<i>Mycobacterium kansasii</i>	ATCC 7646	–	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	+
<i>Mycobacterium kansasii</i>	Patientenisolat	–	–	–	n. t.	n. t.	+
<i>Mycobacterium malmoeense</i>	Patientenisolat	–	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	+
<i>Mycobacterium porcinum</i>	Patientenisolat	–	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	+
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	ATCC 3269	–	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	+
<i>Mycobacterium simiae</i>	Patientenisolat	–	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	+
<i>Mycobacterium szulgai</i>	Patientenisolat	–	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Patientenisolat	+	–	–	n. t.	n. t.	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	R1917c	+	–	–	–	–	+



Spezies	Herkunft	RT-PCR-Nachweise					
		<i>M. tuberculosis</i>	<i>C. pneumoniae</i>	<i>M. pneumoniae</i>	<i>Legionella</i> spp.	<i>L. pneumophila</i>	16S-PCR
<i>Mycobacterium xenopi</i>	Patientenisolat	–	n. t.	n. t.	–	–	+
<i>Mycobacterium xenopi</i>	ATCC 7365	–	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	+
<i>Mycoplasma hominis</i>	Patientenisolat	n. t.	n. t.	–	n. t.	n. t.	+
<i>Mycoplasma hominis</i>	ATCC 14027	n. t.	n. t.	–	n. t.	n. t.	+
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	Bakterienkultur	n. t.	n. t.	–	n. t.	n. t.	+
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Bakterienkultur	n. t.	n. t.	–	n. t.	n. t.	+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FH332	–	–	+	n. t.	n. t.	+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC 29342	–	–	+	–	–	+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Wild type 1	n. t.	–	+	–	–	+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Wild type 2	n. t.	–	+	n. t.	n. t.	+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Wild type 3	n. t.	–	+	n. t.	n. t.	+
<i>Norcardia abscessus</i>	Patientenisolat	–	–	–	–	–	+
<i>Norcardia farcinica</i>	Patientenisolat	–	–	–	–	–	+
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 4479	–	–	–	–	–	+
<i>Proteus vulgaris</i>	DSM 30118	–	–	–	–	–	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	–	–	–	–	–	+
<i>Pseudomonas fluorescense</i>	Patientenisolat	–	–	–	–	–	+
<i>Pseudomonas luteola</i>	Patientenisolat	–	–	–	–	–	+
<i>Flavimonas oryzae</i>	Patientenisolat	–	–	–	–	–	+
<i>Pseudomonas putida</i>	Patientenisolat	–	–	–	–	–	+
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Patientenisolat	–	–	–	–	–	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763	–	–	–	–	–	+
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> ser. <i>Choleraesuis</i>	DSM 5569	–	–	–	–	–	+
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 13880	–	–	–	–	–	+
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Patientenisolat	–	–	–	–	–	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	–	–	–	–	–	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	ATCC 10442	–	–	–	–	–	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DSM 1798	–	–	–	–	–	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ATCC 13637	–	–	–	–	–	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	DSM 20566	–	–	–	–	–	+
<i>Streptococcus agalactiae</i>	DSM 2134	–	–	–	–	–	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Patientenisolat	–	–	–	–	–	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	DSM 20565	–	–	–	–	–	+
<i>Tatlockia/Legionella micdadei</i>	ATCC 33218	n. t.	n. t.	n. t.	+	–	+
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	ATCC 2781845	–	–	–	–	–	+
<i>Vibrio cholerae</i> non O1 Sero var O139	SZ 492493	–	–	–	–	–	+
Σ		82	70	73	80	80	109

**Tabelle 13: Bakterien- und Pilzstämmen der Spezifitäts- und Kreuzreaktionsbestimmung**

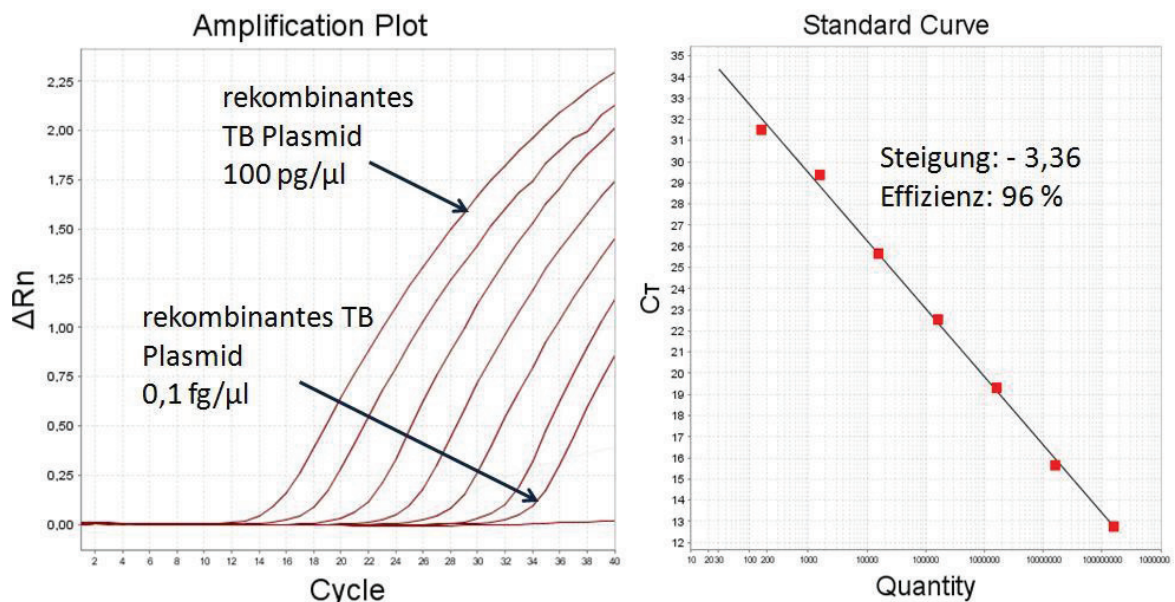
+ = in der entsprechenden RT-PCR zu einem Amplikon/Fluoreszenzsignal führend  
 - = der entsprechenden RT-PCR nicht zu einem Amplikon/Fluoreszenzsignal führend  
 n. t. = nicht getestet



### 3.4.5 Effizienz

Die Effizienz  $E$  gibt an, wie wirkungsvoll ein System arbeitet. Zur Optimierung der Nachweise und Überprüfung der Effizienz wurden Verdünnungsreihen der jeweiligen Ziel-DNAs mit Dilutionsstufen von 1:10 angefertigt. Diese wurden in die verschiedenen RT-PCR-Nachweisverfahren eingesetzt und die zugehörigen  $C_t$ -Werte experimentell ermittelt. Diese Untersuchungen wurden für jeden Parameter 3–5 Mal in unabhängigen Ansätzen wiederholt.

Die Effizienz der Tests wurde mittels der StepOne-Software (Applied Biosystems) anhand der Steigung der aus  $C_t$ -Werten abgeleiteten Regressionsgeraden berechnet:  $X_n = X_0 * (1+E_x)^n$ , (wobei  $X_n$  Zahl der Moleküle in Zyklus  $n$ ,  $X_0$  initiale Molekülzahl,  $E_x$  die Effizienz der Zielamplifikation,  $n$  die Anzahl an Zyklen ist). Da bei Real-Time-Verfahren mit TaqMan-Sonden die Amplifikation von  $X_n$  proportional zur Reporterfluoreszenz  $R$  ist, kann die Formel in folgender Weise umgestellt werden:  $R_n = R_0 * (1+E_x)^n$  ( $R_n$  ist die Reporterfluoreszenz in Zyklus  $n$ ;  $R_0$  ist die initiale Reporterfluoreszenz).



**Abbildung 18: Effizienzparameter beim MTK-Nachweis**

Dargestellt ist der Amplifikationsverlauf einer Verdünnungsreihe in 1:10-Schritten von *M. tuberculosis*-haltiger Plasmid-DNA.

Quelle: Darstellung unter Verwendung der StepOnePlus-Software

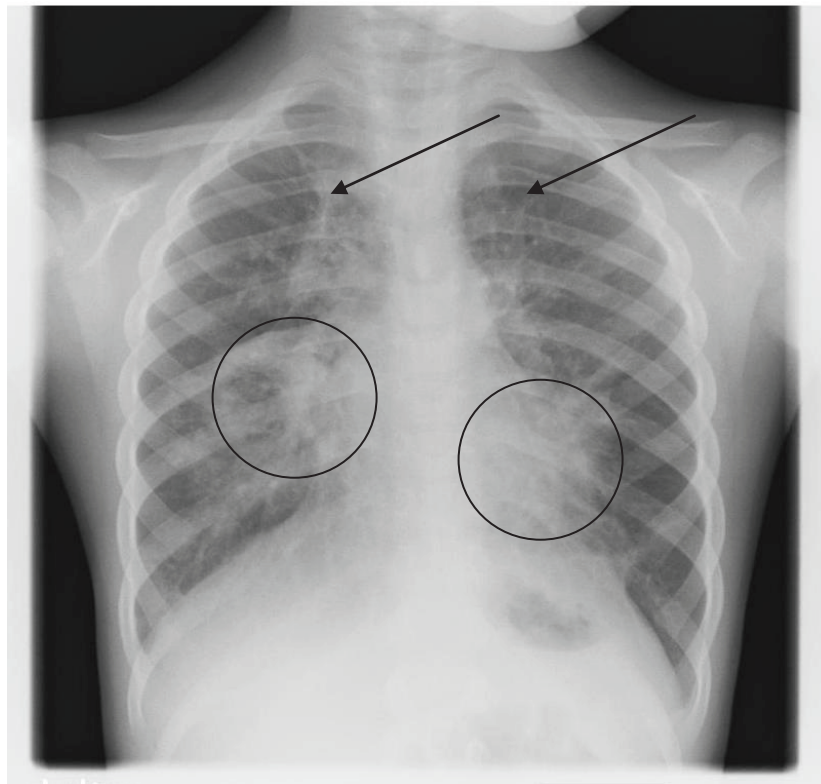
Unter optimalen Amplifikationsbedingungen ( $E = 1,0$ ) betrug die Steigung  $-3,34$ . Abbildung 18 zeigt eine Verdünnungsreihe des rekombinanten Plasmids von *M.-tuberculosis*-Ziel-DNA in einer Konzentration von  $0,1\text{fg}/\mu\text{l}$  bis  $100\text{pg}/\mu\text{l}$  und die daraus generierte Regressionsgerade.

Der Korrelationskoeffizient  $R_2$  beschreibt die Korrelation zwischen der Regressionsgerade und den individuellen  $C_t$ -Werten der Standardreaktionen.  $R_2 = 1$  ist der höchste erreichbare Wert und beschreibt die größtmögliche Annäherung der experimentell ermittelten Daten an eine lineare Abhängigkeit [126]. Beim Nachweis von Mykobakterien des Tuberkulose-Komplexes lag die Testeffizienz durchschnittlich bei  $95,1 \pm 4,0$  ( $R_2 = 0,99$ ). Für den *C.-pneumoniae*-Nachweis zeigte sich eine Effizienz von  $\emptyset 87,7 \pm 8,2$  ( $R_2 = 0,99$ ). Eine Effizienz von  $\emptyset 96,3 \pm 5,4$  ( $R_2 = 0,99$ ) ergab sich für den *M. pneumoniae*. Die durchgeführten Tests wiesen eine errechnete Effizienz von  $\emptyset 97,7 \pm 3,9$  für den *Legionella*-spp.-Nachweis auf und  $\emptyset 100,4 \pm 3,9$  ( $R_2 = 0,99$ ) für den  $\beta$ -Globin-Nachweis. Die höchste errechnete Effizienz lag mit  $\emptyset 101,3 \pm 8,1$  ( $R_2 = 0,99$ ) beim *L.-pneumophila*-Nachweis.

### 3.5 Kasuistik Mykoplasmen-Pneumonie

Ein vierjähriger Junge mit Morbus Down und Zustand nach akuter myeloischer Leukämie und Chemotherapie wurde mit steigendem Fieber bis  $40^\circ\text{C}$  stationär auf der Kinder-Intensivstation aufgenommen und betreut. Anamnestisch hatte das Kind seit ca. sieben Tagen Husten und subfibrile Temperaturen und stand unter einer vor zwei Tagen durch den Hausarzt beginnenden Cefuroximtherapie.

Klinisch fielen vor allem feuchte beidseitige Rasselgeräusche, Tachydyspnoe, Lippenzyanose, anstoßende Atmung und Nasenflügeln auf. In der Röntgen-Thoraxaufnahme zeigte sich eine diffuse Zeichnungsvermehrung beidseits ohne Erguss, rechts deutlicher als links (Abbildung 19).



Pfeile:

Apikal feinstreifig-  
retikuläre  
Verschattungen

Kreise:

Dichtere Infiltrationen  
insb. um die rechten  
und linken Hili in den  
Unter- bzw.  
Mittelfeldern

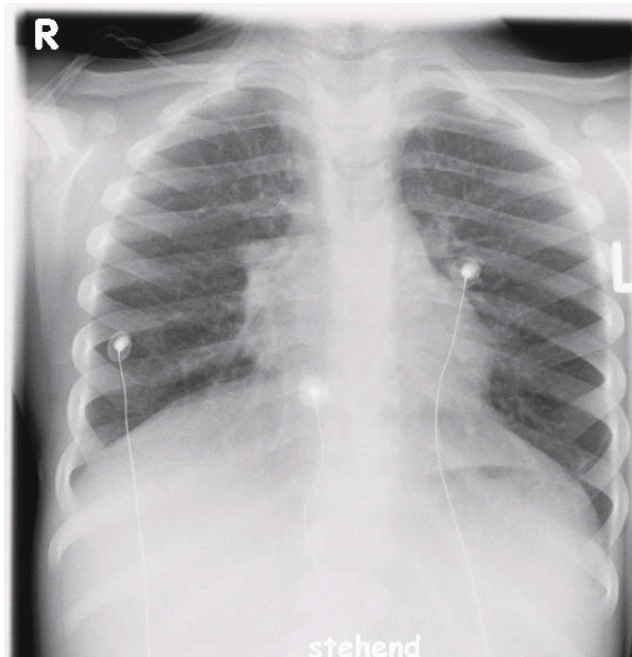
**Abbildung 19: Röntgenaufnahme p. a. eines 4-jährigen Patienten mit akuter Mykoplasmenpneumonie (bei Aufnahme)**

(mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. K. Hauenstein, Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universität Rostock)

Stationär erfolgte die Umstellung der Antibiose auf Erythromycin und Clindamycin. Bei respiratorischer Insuffizienz war der Patient parallel auf eine CPAP-Atemhilfe angewiesen. Unter dieser Therapie kam es innerhalb von zwei Tagen zur Besserung des Befundes, und die Sauerstoffapplikation konnte auf eine Nasensonde umgestellt werden.

In einer Sputumprobe wurde mit der RT-PCR *Mycoplasma pneumoniae* nachgewiesen; die Serologie jedoch blieb negativ. Im durch Kulturansatz untersuchtem Sputum und Rachenabstrich fand sich zusätzlich *Candida albicans* in großer Menge; entsprechend wurde auch die medikamentöse Therapie um Fluconazol erweitert. Eine Infektion mit *Chlamydomydia pneumoniae*, *Chlamydomydia psittaci*, *Coxiella burnetii*, Cytomegalievirus oder Legionellen konnte nicht nachgewiesen werden.

Im stabilen Zustand erfolgte am Tag 9 nach Aufnahme die Verlegung auf eine Normalstation der pädiatrischen Onkologie. Trotz der Besserung der radiologischen Befunde dauerte der respiratorisch unzureichende Status des Patienten an; zusätzlich fielen auskultatorisch ein expiratorisches Giemen und fein- bis mittelblasige Rasselgeräusche auf. Ab dem 18. Tag nach Aufnahme wurde deshalb noch mit Clarithromycin 2 × 250 mg therapiert. Eine bakterielle Superinfektion konnte nicht ausgeschlossen werden, auf eine erneute mikrobiologische Untersuchung wurde verzichtet.



- Beidseitige deutliche Blähung der Lunge
- interstitielle Zeichnungsvermehrung deutlich regredient
- betonter Hilus rechts
- streifige Dystelektasen insb. im rechten Mittellappen und rechts zentral mit Verschattung der rechten Herzkontur

**Abbildung 20: Röntgenaufnahme p. a. eines 4-jährigen Patienten nach akuter Mykoplasmenpneumonie, Verlaufskontrolle am 11 Tag nach Aufnahme**

Nach 22 Tagen stationärer Behandlung konnte der Patient stabil und in gutem Allgemeinzustand in die Häuslichkeit entlassen werden.

Die Falldarstellung demonstriert, welche Patientengruppen prädestiniert sind und welche Rolle eine adäquate, zeitgerechte Diagnose spielen kann. Serologische Verfahren sind dabei für die zeitgerechte Diagnostik insb. bei komplexen, multiplen Infektionserregern bei Intensivpatienten nicht ausreichend. Das Wissen um die pathogenen Erreger insb. Mykoplasmen hat den Umgang mit der Erkrankung, die Therapie und das Prozedere entscheidend beeinflusst.

## 4 Diskussion

Die Diskussion stellt zusammenfassend dar, welche Vor- und Nachteile ein kombiniertes RT-PCR-Verfahren im Vergleich zu anderen diagnostischen Verfahren sowie zum Einzel-PCR-Nachweis hat. Weiterhin wird das hier entwickelte System mit aktuellen Publikationen ähnlicher Intention verglichen und bewertet.

Abschließend werden Konsequenzen aus der Integration in den Routinebetrieb erläutert und unter praktischen Aspekten dargestellt.

### STELLENWERT DES NUKLEINSÄURENACHWEISES IN DER MIKROBIOLOGISCHEN DIAGNOSTIK

Die Detektion von atypischen Pneumonieerregern stellt besonders hohe Ansprüche an die nachweisenden Verfahren. Aufgrund der maximalen Spezifität, der Möglichkeit der Resistenztestung und etwaiger epidemiologisch relevanter Typisierung ist für die meisten Erreger die kulturelle Anzucht der Goldstandard [48, 127].

Bei der Tuberkulose ist die schnelle und sichere Differenzierung zu Mykobakteriosen durch MOTT essentiell für eine schnelle, adäquate Therapie, weil diese sich für beide Erkrankungen grundlegend unterscheidet. Eine wesentliche Rolle spielt dies bei HIV-Erkrankten, aber auch bei anderen chronisch oder akut Immuninkompetenten und Intensivpatienten. Die zeitgerechte Identifikation von Tuberkulosepatienten, nicht aber von MOTT-Patienten ist darüber hinaus zur Einleitung von Isolations- oder Barrieremaßnahmen zum Schutz anderer Patienten und des Personals zwingend erforderlich. Zusammenfassend stellt die RT-PCR eine Alternative aber keinen vollständigen Ersatz der Kultur dar. Langfristig könnte sie die Kultur als Goldstandard ablösen bzw. ergänzen [100].

Der mikroskopische Nachweis von MTK-Bakterien und die MTK-Kultur sind in der Summe noch immer die am häufigsten angewendeten Methoden für diese Gruppe von Mikroorganismen [6]. Der Goldstandard Kultur ist mit einer durchschnittlichen Dauer von 12–84 Tagen extrem zeitaufwendig, während die mikroskopische Abstrichuntersuchung nur von akzeptabler Sensitivität (80-90-94 % für die Untersuchung von ein-zwei-drei Sputen) und fehlender Spezifität gekennzeichnet ist. So ist keine Differenzierung innerhalb der säurefesten Stäbchen möglich.

Der kulturgebundene Nachweis von Chlamydien und Mykoplasmen ist nur in eukaryoten Zellkulturen bzw. nur mit sehr speziellen Kultivierungsmethoden möglich und daher Speziallaboratorien vorbehalten (vgl. 1.4.2, 1.4.3).

Direkte mikroskopische Nachweisverfahren mit spezifischen Färbetechniken stehen auf kommerzieller Basis nicht zur Verfügung. Serologische Verfahren sind mit Vorsicht zu interpretieren und schneiden in der Akutdiagnostik aufgrund des ggf. über Wochen abzuwartenden Titerverlaufes im Vergleich zu Kultur- und PCR-Nachweisen schlecht ab. Ein weiteres Problem ist die geringe Korrelation von Serologie und Kultur bzw. PCR, wie Studien für *C. pneumoniae* belegten (vgl. 1.4) [128, 129].

Die 3–5-tägige kulturelle Anzucht von Legionellen auf Spezialnährböden wurde viele Jahre lang als Goldstandard betrachtet [99, 100], sie weist jedoch nur eine Sensitivität von nur 50–60 % für *Legionella pneumophila* auf [62]. Die Nachweisgrenze liegt bei diesem Verfahren bei ca.  $10^4$  Bakterien pro ml [20].

Zusammenfassend vergleicht Tabelle 14 die Argumente für und gegen mikroskopische sowie Kulturverfahren mit denen für RT-PCR-Methoden zum Nachweis der oben genannten Erreger.

Als diagnostisches Verfahren kann die Kultur aufgrund von bestimmten Vorteilen (Antibiotika-Resistenztestung, epidemiologischer Typisierung) gegenwärtig nicht ersetzt werden. Wie in den Untersuchungen festgestellt werden konnte, sind RT-PCRs hinsichtlich der Schnelligkeit, Sensitivität und retrospektiven Beurteilung der Bakterienkultur häufig überlegen. Allerdings sollte jede Diagnosestellung immer aus einer Zusammenschau von mikrobiologischem Befund, klinischem Eindruck und technischer Bildgebung erfolgen.

Ein schneller Nachweis wie das hier etablierte Verfahren führt zur zeitgerechten Einleitung einer geeigneten Therapie sowie ggf. notwendiger hygienischer Maßnahmen und vermindert so Krankheitsdauer und eventuell auch die Schwere der Erkrankung. Dies wiederum kann zur Senkung der Therapiekosten, des Aufwands an Medikamenten und Auftretens entsprechender Nebenwirkungen



sowie zur Minderung der Ausbildung von Resistenzen durch die Selektionsmechanismen durch die Antibiotikatherapie führen.

	Kultur	RT-PCR
<b>Transport</b>	schneller Transport essentiell wegen der Begleitflora	schneller Transport bevorzugt, da Schädigung durch Nukleasen möglich
<b>Erregerzustand</b>	vitaler Erreger nötig	Nachweis auch avitaler Erregerbestandteile möglich
<b>Durchführung</b>	z. T. Speziallaboratorien (Chlamydien, Mykoplasmen) und besondere Sicherheitsvorkehrungen (TB)	an technische Geräte gebunden, kontaminationsfreies Arbeiten in verschiedenen Räumen nötig
<b>Zeitaufwand</b>	Akutdiagnostik nur bei schnellwachsenden Spezies (< 3 Tage)	schnell (< 3 h)
<b>Verlaufsbeurteilung</b>	nur prospektiv	Therapiekontrolle* + retrospektiv + prospektiv
<b>Kosten</b>	vergleichsweise günstig (Chlamydien ausgenommen)	hoch
<b>Therapiekontrolle</b>	wegen Dauer der Durchführung nur eingeschränkt geeignet	Teilweise ungeeignet (TB), da keine Differenzierung vitaler/toter Erreger; Ausscheidung toter Erreger ggf. auch lange nach erfolgreicher Therapie
<b>Resistenztestung</b>	prinzipiell möglich**	nicht geeignet, prinzipiell möglich
<b>Sensitivität</b>	weniger sensitiv (ca. $10^4$ Bakterien/ml)	hochsensitiv ( $10^2$ – $10^3$ Bakterien/ml)
<b>Spezifität</b>	hoch	in der Regel hoch
<b>Spezies-Differenzierung</b>	nicht direkt möglich	abhängig von Genwahl und ggf. Sequenzierung gut möglich
<b>Besonderheiten</b>	Beeinflussung durch Begleitflora	verschiedene Genorte unterschiedlich gut geeignet
	auch für Gewebspräparate gut geeignet	cave: Inhibition z. B. Heparin, EDTA

**Tabelle 14: Vergleich von Real-Time-PCR und Kultur**

\* RT-PCR positive Resultate können bei Mykobakterien trotz adäquater Therapie und guter klinischer Reaktion noch monatelang nachgewiesen werden [130, 131].

\*\* für Chlamydien und Mykoplasmen nicht etabliert und für Legionellen ohne Bezug zur klinischen Wirkung

Bei der Übernahme des hier entwickelten Systems in die Institutsroutine des Uniklinikum Rostock konnte gezeigt werden, wie günstig sich die schnelle Einschätzung von Tuberkulosefällen auf den Klinikalltag ausübte.

In den Versuchen und im Vergleich mit der aktuellen wissenschaftlichen Fachliteratur (vgl. Tabelle 15) konnte gezeigt werden, dass die hier etablierten Nachweise dem wissenschaftlichen Standard in jeder Weise entsprechen. Sie wurden zudem in Qualitätskontrollen extern durch die Ringversuche der

Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e. V (INSTAND) und intern durch die Validierung nach Rabenau et al. [123] hinreichend geprüft.

#### AUSWAHL VON ZIELSEQUENZEN FÜR DEN NUKLEINSÄURENACHWEIS

Seit der ersten Publikation über PCR-Verfahren für den Nachweis von Tuberkuloseerregern von Shankar et al. 1990 [132] werden in den Laboralltag PCR-Verfahren integriert. Dies sind Eigenentwicklungen (sogenannte In-House-Tests) und Systeme auf kommerzieller Basis. Dabei kommen unterschiedliche Techniken und Zielsequenzen zur Anwendung. Neben der konventionellen PCR mit anschließender Gelelektrophorese gibt es zur Amplikon-Detektion noch die Möglichkeit der Southern-Blot-Hybridisierung, Semi-nested-PCRs, Sequenzierung und Enzyme-linked Immunosorbent Assays [41].

Beim Nachweis von MTK-Bakterien haben sich neben dem 16S-rDNA-Gen das *hupB*-Gen [133], *pPH7301* [134], *IS986* [135] und das 65 kDa-Antigen [136] als geeignete Zielsequenzen erwiesen.

Die am häufigsten eingesetzten Zielsequenzen sind jedoch:

- die mykobakterielle 16S rRNA [137, 138] (zahlreiche publizierte Protokolle, kommerzielle Anwendung u. a. im COBAS Amplicor System von Roche)
- das *MBP64*-Gen [134, 136, 139-141], welches zu sehr sensitiven und spezifischen Nachweisreaktionen führt [110]
- das am häufigsten als Zielsequenz verwendete Insertionselement *IS6110* [106-111]

Die *IS6110*-Region ist spezifisch für MTK-Bakterien. Entscheidend für die Sensitivität des Nachweises ist das Vorliegen von zumeist multiplen Kopien pro Genom. Genetisch außerdem ist das *IS6110*-Element extrem stabil, d.h. es variiert nicht in verschiedenen MTK-Stämmen, mutiert nicht und verändert sich auch nicht durch lange *in vitro* Passagen [142]. Aus diesen Gründen wurde das *IS6110* für die vorliegende Arbeit gewählt.

Der hohe Konservierungsgrad des Insertionselement *IS6110* bewirkt, dass keine Differenzierung zwischen den einzelnen MTK-Stämmen möglich ist.



Die gemeinsame Detektion von MTK-Bakterien wurde favorisiert, obwohl ca. 98 % der klinisch apparenten Tuberkulosefälle in Deutschland durch *M. tuberculosis* verursacht werden (vgl. 1.4.1). Aus therapeutischer Sicht kann die Differenzierung innerhalb des MTK relevant sein, weil *M. bovis* intrinsisch resistent gegen Pyrazinamid ist (Robert Koch Institut 2004 [17]). Eine sich an die RT-PCR anschließende Sequenzierung, die sich stets an ein positives RT-PCR-Ergebnis von Patientenmaterial zur Routinediagnostik anschloss, konnte eine entsprechende Einschätzung erleichtern. Ebenso ist eine Differenzierung innerhalb der MTK-Bakterien mittels anschließender PCR möglich, z. B. mit der Wahl der Zielgene *pncA* [143-145], *gyrB* [146], *oxyR* [147], *katG* [148] und *hupB* [149].

Für den *C.-pneumoniae*-Nachweis ist alternativ zur hier verwendeten *ompA*-Zielsequenz auch der Nachweis über 16S-rDNA-Abschnitte [127, 150, 151] oder das sogenannte *Pst-I*-Fragment [152-155] möglich. Die *ompA*-Sequenz wurde ausgewählt, weil sie am Besten etabliert ist [40, 150, 156-159].

Mykoplasmen lassen sich über das Repetitive Element *repMp1* [36] oder die 16S rDNA nachweisen. Letztere Zielsequenz wird auch von kommerziellen Testsystemen wie „Pneumoplex“ [127] verwendet. Hier wurde das Adhäsion P1-Gen als Zielregion verwendet, weil es sich in den aktuellsten Publikationen als hochsensitiv und spezifisch erwiesen hat [40-44].

Der PCR-Nachweis für alle Legionellen kann über die Zielsequenz 26S-5S-intergenic-region erfolgen [40], die 5S rDNA [100] und 16S rDNA (s. u.). Für *L. pneumophila* ist das *mip*-Gen spezifisch und wurde in mehreren Publikationen [100, 127] erfolgreich als PCR-Zielsequenz eingesetzt. Es führt nach Hayden et al.[100] jedoch zu weniger sensitiven Nachweisreaktionen als die 16S -rDNA-Zielsequenzen, da es als Single-Copy-Gen gegenüber den Multicopy-rDNA-Genombereichen vorliegt. Die 5S-rDNA-Region ist als Zielsequenz weniger gut geeignet, weil sie mit hoher Homologie auch in Pseudomonaden vorkommt [28]. Die am häufigsten als Zielsequenz verwendete 16S-rDNA-Region ist hinreichend spezifisch und etabliert [48, 49, 100, 121, 150, 160]. Sie wird daher von kommerziellen Testsystemen genutzt [160] und bildet auch in dieser Arbeit die Grundlage für den Mykoplasmen-Nachweis.

Die Auswahl der Primer und Sonden ist ein kompliziertes Unternehmen, welches hier nur angerissen werden kann. Trotz sorgfältiger theoretischer Untersuchungen mussten in dieser Arbeit oftmals ausgewählte Primer und Sonden aus den oben genannten Gründen wieder verworfen und abgeändert werden. So entfiel neben anderen z. B. ein kurzes  $\beta$ -Globin-Amplikon mit 96 bp, vier Legionellen-Primer und sechs Legionellen-Sonden.

#### GRUNDIDEE MULTIPLEX UND VERGLEICH MIT AKTUELLEN PUBLIKATIONEN

Die Grundidee des kombinierten Nachweises für verschiedene respiratorische Erreger ist wegen der ähnlichen klinischen Symptomatik und der Zugehörigkeit zu einem differenzialdiagnostischen Komplex naheliegend. Seit der ersten Publikation zum simultanen Nachweis von mindestens zwei atypischen Pneumonieerregern durch Garin et al. [161] erschienen weitere Veröffentlichungen zu verschiedenen, stark variierenden Multiplex-Systemen. Einen Überblick über diese Publikationen gewährt Tabelle 15.

Quelle	[161]	[155]	[152]	[127]	–	[40]	[153]	[151]	[162]	–	[163]	[154]
Autoren	Garin et al. 1999	Welti et al. 2002	Pinar et al. 2004	Khanna <sup>3</sup> et al. 2004	ProPneu <sup>3</sup>	Ginevra <sup>3</sup> et al. 2005	McDonough et al. 2005	Raggam et al. 2005	Strålin et al. 2005	diese RT-PCR 2007	Loens <sup>3</sup> et al. 2008	Wang et al. 2008
Datum	–	–	–	✓	✓	✓	–	–	–	–	✓	–
Kommerziell verfügbar	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Gesamtzahl der Erregernachweise	3	3	3	5	2	4	4	3	4	5	3	12
Erreger, Zielsequenzen	–	–	–	Porin <sup>1</sup>	–	–	IS481	–	–	– <sup>2</sup>	–	Porin
<i>Bordetella pertussis</i>	ompA	Pst-I	Pst-I	ompA	ompA	ompA	Pst-I	16S	ompA	ompA	16S	Pst-I separat
<i>C. pneumoniae</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	16S	–	–	–
<i>Haemophilus influenzae</i>	–	–	–	mip	–	–	–	–	–	16S	–	–
<i>Legionella micdadei</i>	mip	mip	mip	mip	–	23S-5S	mip	–	–	16S	–	mip
<i>Legionella pneumophila</i>	–	–	–	–	–	23S-5S	–	–	–	16S	–	–
<i>Legionella</i> spp.	P1	P1	16S	16S	16S-23S	P1	P1	16S	P1	P1	16S	16S-23S
<i>M. pneumoniae</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	IS6110	–	sen-reg separat
<i>M.-tuberculosis-Komplex</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	Autolysin	–	–	–
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
weitere	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5
Methoden	✓	–	✓	–	–	–	✓	–	✓	–	–	–
PCR und Elektrophorese	–	–	–	✓	–	✓	–	✓	–	–	–	✓
PCR und Hybridisierung	–	–	–	✓	✓	–	–	–	–	–	–	–
LC- RT-PCR	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
RT-PCR (SYBR Green)	–	–	–	–	–	✓	–	✓	–	–	–	–
RT-PCR (TaqMan)	–	✓	–	–	–	–	–	–	–	✓	–	–
NASBA-PCR (mol. beacons)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	✓	–
Kombination	multiplex	duplex	multiplex	multiplex	duplex	multiplex	multiplex	parallel	multiplex	multiplex*	multiplex	multiplex
Zeitaufwand	o. A.	4–5h	o. A.	2–5 h	o. A.	6,5 h	o. A.	3 h	o. A.	2–3 h	o. A.	o. A.
Sensitivitäten in %	o. A.	o. A.	o. A.	99–100	90–99	100	o. A.	o. A.	o. A.	91–100	o. A.	o. A.
Spezifitäten in % <sup>3</sup>	o. A.	o. A.	o. A.	96–100	95,2–100	100	o. A.	o. A.	o. A.	99–100	o. A.	o. A.

**Tabelle 15: Vergleich von Multiplex-Methoden zum Nukleinsäurenachweis von Pneumonieerregern**

<sup>1</sup> nicht in der Real-Time-Version

<sup>2</sup> *Bordetella-pertussis* -Nachweis in Vorbereitung

<sup>3</sup> kommerzielles Produkt

\*duplex und parallel=kombiniert

die Angaben 16S, 5S, 23S beziehen sich auf die rDNA-Genomabschnitte

o. A. ohne Angabe

Das hier vorgestellte System unterscheidet sich von den oben genannten Verfahren in 1) Zusammenstellung der Nachweise, 2) Methodik, 3) Gesamtkonzept der simultanen Detektion und 4) Erweiterungsmöglichkeiten:

### **1) Zusammenstellung der Nachweise**

- **Integration des Nachweises von *M.-tuberculosis*-Nukleinsäure**

Die Kombination des Nachweises von atypischen Pneumonieerregern mit *M. tuberculosis* deckt die wichtigsten differenzialdiagnostisch relevanten respiratorischen Erreger ab. Die Relevanz von MTK-Bakterien bei ambulanten Pneumonien zeigte z. B. eine Studie aus Baltimore, bei der aufgrund mangelnder Diagnostik und Differenzialdiagnose 16 von 33 Patienten (48 %) ursprünglich als CAP-Fälle interpretiert und behandelt worden waren [164]. Den Nachweis von MTK-Bakterien hat bisher nur ein anderes Testverfahren (Wang et al.,[154]) erfolgreich integriert und umgesetzt. Dabei umfasste dieses zusätzlich elf andere Erreger mittels eines In-Tube-Verfahren, d. h. der simultanen Präsenz aller Amplifikationsprimer und Detektionssonden. Die Sensitivität eines solchen Verfahrens sollte hinterfragt werden. Die Erfahrung aus dem hier entwickelten Verfahren wie auch aus zahlreichen anderen Publikationen hat jedoch gezeigt, dass die Sensitivität von Nukleinsäureamplifikationstechniken mit steigender Komplexität exponentiell abnimmt.

- **Differenzierung von Legionellen**

Es wird *simultan* zwischen Legionellen-Spezies allgemein und *L. pneumophila* differenziert. Diese sofortige Diskriminierung wurde aufgrund der besonderen Bedeutung von *L. pneumophila* für schwere klinische Verläufe einerseits und der Bedeutung anderer Legionellenarten für außerhalb von Kliniken erworbenen Legionellosen (insb. für Immunsupprimierte) andererseits als wichtig betrachtet [55] [48, 49, 51-54, 56, 57]. Die Differenzierung zwischen *L. pneumophila* und anderen *Legionella*-Spezies war durch die Verwendung von zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen noch während des Amplifikationsprozesses möglich und erwies sich in der Praxis als leicht praktikabel. Während der Prüfungsphase dieses Nachweises wurde keine humane Non-*L.-pneumophila*-Infektion nachgewiesen, allerdings sind diese auch extrem selten. Die exakte Unterscheidung zwischen den einzelnen Spezies war durch eine sich

anschließende Sequenzierung nötig. Für die Klinik, Therapie und den Umgang mit hygienischen Maßnahmen von bzw. mit Legionellen spielt diese Differenzierung jedoch eine untergeordnete Rolle im Vergleich zur Wichtigkeit der prompten Diskriminierung zwischen *L. pneumophila* und Non-*L. pneumophila*, welche durch Real-Time-Verfahren exzellent möglich ist.

- **Inhibitionskontrolle unter Verwendung des humanen  $\beta$ -Globin-Gens**

Durch den Nachweis des humanen  $\beta$ -Globin-Gens in das Testsystem wurde eine sensitive Inhibitionskontrolle integriert. Vorteilhaft ist dabei die Kontrolle der Effizienz der DNA-Präparation durch die simultane Erfassung humaner Zellen, die in den zu untersuchenden Materialien typischerweise in ausreichender Menge vorliegen. Eine Inhibitionskontrolle ist zwingend notwendig, weil je nach Material und Präparationsmethode die (RT-) PCR in aufgearbeiteten Materialien unzureichend effizient arbeitet, z. B. beim Umgang mit Paraffinpräparaten [100].

## **2) Methodik**

- **Amplifizierte Genomabschnitte und Amplikon-Größen**

Die hier vorliegende Kombination von Zielsequenzen und Erregern wird von keinem der anderen Systeme genutzt. Die Auswahl der Genorte orientierte sich durch sorgfältige Prüfung an der aktuellen wissenschaftlichen Grundlage.

Der Erfolg einer Amplifikation wird auch von der Größe der Amplifikate entscheidend beeinflusst. Je größer die Zielsequenz, desto wahrscheinlicher ist die Möglichkeit der Interaktionen von DNA miteinander. Dies erschwert die Abgrenzbarkeit von spezifischen Amplifikaten gegen Primerdimerbildung und führt zur Einschränkung der Spezifität durch zu kurze Genabschnitte oder zur Einschließung unspezifisch kodierender Genabschnitte. In den meisten der oben genannten Publikationen finden sich deutlich größere Amplikons von ca. 200–630 bp, während die Größen in dieser Arbeit zwischen 108-243 bp lagen.

Ein weiterer Vorteil von kleinen Amplifikaten ist die Verkürzung der Zyklusdauer im Amplifikationsprozess, da entsprechend weniger Zeit für die Elongation etc. nötig wird. Die Grenze der Amplikongröße nach unten ist allerdings nicht unbeschränkt, da bei zu kurzen Strängen Primer und Sonden interagieren und einander behindern können. So ist das Festlegen der Amplikongröße eine Gradwanderung zwischen der Spezifität, der Einbeziehung repräsentativer

Genabschnitte und der Zeitanforderung für den Amplifikationsprozess. In neueren Publikationen von PCR-Protokollen wird im Vergleich mit den früheren Protokollen mit deutlich kürzeren Amplikons gearbeitet. Dies ist sicher nicht nur eine Frage der Generation, sondern auch der Entwicklung empfindlicherer, verbesserter PCR-Chemikalien und Gerätschaften.

Die hier gewählten Größen stellen einen Kompromiss dar, jedoch haben sie sich im Verlauf gut etablieren können.

- **TaqMan-Sonden und Real-Time-PCR**

Verwendet wurden Sonden vom TaqMan-Typ, die für alle typischen Real-Time-Instrumente außer LightCycler (LC) verwendet werden können.

Die Vorteile von Real-Time-PCR-Verfahren sprechen für die sich ständig erweiternde Publikationsliste von Erregernachweisen. Illustrativ lässt sich eine Studie anführen, die Real-Time-PCRs mit Röntgen-Thorax-Bildern und konventionellen diagnostischen Verfahren vergleicht. Dabei waren die PCR-Methoden überdurchschnittlich sensitiver bei der Detektion von atypischen, bakteriellen Erregern und Viren [165].

### **3) Gesamtkonzept der simultanen Detektion**

- **Duplex-PCR kombiniert mit simultaner Detektion**

Die meisten Multiplex-Systeme bestehen aus einem Multi-Mastermix, der sämtliche Primer und ggf. Sonden in einem Reaktionsgefäß (In-Tube-Verfahren) beinhaltet. Tendenziell entscheidet sich eine zunehmende Zahl von Autoren aus Kostengründen und wegen der schnelleren Handhabbarkeit für einen Multi-Mastermix.

Dagegen sind Einzel- gegenüber Duplex- und Multiplex-Nachweisen bevorteilt durch eine hohe Sensitivität und eine größere Spezifität aufgrund einer geringeren Zahl möglicher Fehlpaarungen durch thermodynamische Gesetzmäßigkeiten. Nachteilig wirken sich ein höherer Arbeitsaufwand, größere Reaktionsvolumina sowie dadurch verursacht höhere Kosten aus.

Das hier gezeigte Verfahren wurde ursprünglich für die Verwendung am Zwei-Kanal-Real-Time-Instrument entwickelt, bei dem eine weitere Farbkanaltrennung unmöglich ist. Es enthält Reaktionsansätze für jeweils zwei

Nachweise (duplex). Die drei Duplex-Einheiten wurden dann parallel auf einer 96-Kavitäten-Platte in einem Analyseverfahren untersucht.

Nach Anschaffung eines Vier-Kanal-Instruments zeigte sich jedoch, dass sich die Qualitätsparameter für Kombination von mehr als zwei Nachweisen in einem Reaktionsgefäß verringerten.

Möglicherweise kann die Verwendung größerer Volumina bei dann geringeren Konzentrationen von Primern und Sonden die Reaktionskinetik ungünstig beeinflussen. Allerdings änderten sich bei der Testung verschiedener Primer- und Sonden-Konzentrationen innerhalb des üblichen Bereichs von 50–900 nM für Primer und 100–500 nM für Sonden [118] die Sensitivitätsgrenzen minimal, so dass die experimentellen Daten eher widersprechen.

- **Freie Belegung der Kavitäten auf der Trägerplatte**

Die Verteilung der Einzel- und Duplexnachweise kann im hier eingesetzten RT-Instrument frei zugunsten variierender Anforderungen auf der Platte angeordnet werden. Dies ermöglicht die Anpassung an die genau geforderte Probemenge und vermeidet leere Reaktionsgefäße bei einem nicht ausgelasteten PCR-Lauf. Derart praktische Hinweise werden typischerweise in den publizierten Protokollen nicht angegeben. Zumindest bei den kommerziellen Tests ist diese Variierbarkeit eingeschränkt bis nicht möglich, da nur eine definierte Menge Material für Inhibitions-, Positiv- und Negativkontrollen vorgesehen ist.

- **Zeitaufwand und Temperaturschema**

Der Zeitaufwand ist abhängig vom PCR-Instrument, von der Methode und der Probenanzahl. RT-PCR-Systeme sind anderen PCR-Verfahren im Zeitvergleich überlegen, weil die Signaldetektion simultan mit der Amplifikation erfolgt. Auf den anschließenden Amplikon-Nachweis kann meist verzichtet werden.

Die Zweischnitt-Amplifikationszyklen (vgl. Abbildung 9, S. 43) bringen eine weitere Zeiteinsparung von ca. 20 % gegenüber einem Dreischnittzyklus. Damit beläuft sich der Gesamtzeitaufwand für Ansatz, Amplifikation und Detektion pro Platte auf ca. 2 bis 3 Stunden.

#### **4) Erweiterungsmöglichkeiten**

Die freie Plattenbelegung erlaubt die einfache Ergänzung um andere Nachweise, sofern diese unter den gewählten PCR-Rahmenbedingungen funktionieren. So

wird gegenwärtig eine Erweiterung des Systems für andere Pneumonieerreger wie der Nachweis von *Bordetella pertussis* geprüft.

#### MULTIPLEX-PCR-SYSTEME UND KOINFEKTION

Bis zu 41 % der mit pneumonischen Symptomen hospitalisierten Patienten weisen eine Koinfektion mit mindestens zwei Erregern auf [166]. An Bedeutung gewinnt dieser Sachverhalt, wenn der Kliniker ihn bei seinen therapeutischen Erwägungen insb. bei immunsupprimierten Patienten nicht berücksichtigt.

In zwei Publikationen für Pneumoniediagnostik mittels Nukleinsäuretechniken wird der Einsatz von bis zu 40 Primerpaaren in Multiplex-PCR-Systemen ohne Sensitivitätsverlust für möglich gehalten [154, 167]. Beide Autorengruppen benutzten jedoch konventionelle PCR-Systeme und schlossen eine Reverse-Line-Blot-Hybridisierung für die spezifische Detektion der PCR-Produkte an den Amplifikationsschritt an.

In den Experimenten dieser Arbeit war die Kombination von mehr als zwei Tests in einem Reaktionsgefäß wegen des Sensitivitätsverlusts und der erhöhten Raten an Primerdimerbildung nicht sinnvoll, außerdem eine Interaktion zwischen den Sonden zu vermuten.

So stellt die Duplex-Variante einen vertretbaren Kompromiss dar, der die Notwendigkeit des Nachweises verschiedener Erreger, Qualitätsparameter der Tests und ökonomische Rahmenbedingungen ausreichend berücksichtigt [163].

#### MODIFIZIERTE PATIENTENPROBEN

Zu Validierungszwecken war eine große Anzahl an Patientenproben nötig. Da die Fallzahl positiver Patienten mit Materialeinsendungen zur mikrobiologischen Diagnostik begrenzt war, wurden Patientenproben modifiziert. Dazu wurden Inhibition- sowie nachweislich erregerefreie Patientenproben ausgesucht. Diesen Materialien wurden definierte Mengen Referenz-DNA aus Kultur oder rekombinanter Plasmid-Lösung zugegeben.

Allerdings können bei der Verwendung derart präparierter Proben im Vergleich zu original klinischen Patientenproben Abweichungen im Reaktionsverhalten nicht ausgeschlossen werden. Ein Originalpräparat enthält nicht nur die gesuchte Ziel-DNA sondern auch eine ganze Menge an Zellmaterial, welches zum Beispiel



inhibitorische Wirkung auf die PCR-Verfahren haben könnte. Durch die Zugabe von zuvor negativ getestetem Patientenmaterial wurde versucht, dieses Problem durch die  $\beta$ -Globin-Testung zu umgehen.

Eine realitätsnähere Variante der modifizierten Proben wäre die Infektion kleinerer Säugetiere mit dem entsprechenden Erreger oder der Zusatz von lebenden Bakterien zu Patientenmaterial und die anschließende routinemäßige Aufbereitung. Aus Zeitgründen wurde keine dieser beiden Möglichkeiten getestet, stattdessen wurde die Inhibition z. B. durch den Matrix-Effekt getestet (vgl. 3.1.2). Die Untersuchungen dieser Arbeit haben gezeigt, dass eine mögliche Inhibition durch Zellbestandteile humaner Zellen keinen Einfluss auf das Ergebnis hat. Eine Inhibition durch erregereigene Bestandteile wurde nicht untersucht, da vorangegangene Untersuchungen an konzentrierten Bakterienzellkulturen keine entsprechenden Hinweise lieferten. Die Amplifikationsgrenzen der aus Kultur gewonnenen chromosomalen Bakterien-DNA waren entsprechend der Patientenprobenaufarbeitung um den Faktor 1000 komplexer (vgl. 3.4.2, S. 63).

#### BEWERTUNG SCHWACH-POSITIVER PROBEN

Bei der Bewertung von positiven und schwach-positiven Proben ist die Möglichkeit der Kontamination eines der Hauptprobleme. Diese kann während der Probegewinnung, beim Transport oder der Lagerung und der Arbeit mit DNA-haltigen Proben im PCR-Labor auftreten. Um zumindest die letzten zwei Problempunkte zu minimieren, ist es unerlässlich, dass jeder Einzelschritt wie Aufreinigung und Extraktion der Patientenproben, Präparation des Masteransatzes, Einbringen von DNA sowie der Ansatz von Kontrollen in verschiedenen Räumlichkeiten durchgeführt wird (Tabelle 2). Da dies in der vorliegenden Arbeit strikt befolgt wurde, sollten zumindest falsch-positive Nachweise durch Amplifikat-Verschleppung auf ein Minimum verringert sein [106, 168]. Trotzdem stellt die Kontamination insb. von Mykobakterien im Laboralltag ein wichtiges Problem dar [169]. So war die Präparation von positiven Mykobakterienkulturen und Patientenmaterial zur Differenzierung sowie Resistenztestung im S3-Labor in derselben Sicherheitswerkbank unumgänglich.

Ein anderes Problemfeld der Kontamination war in dieser Arbeit weniger gut beherrschbar. Wegen des Legionellen-Status als wasserassoziierter Keim ist der Nachweis von Legionellen aus Proben, die mittels bronchioalveolärer Lavage (BAL) gewonnen wurden, mit Vorsicht zu beurteilen. Technisch bedingte Verunreinigungen bei der Instillation von Spülflüssigkeiten sowie bei der Aufbereitung der Endoskope sind möglich. Der Aufbereitungsprozess wird zwar kulturell mikrobiologisch kontrolliert, aber ohne jemals dafür molekulare Verfahren einzusetzen.

Ein positiver und schwach-positiver PCR-Nachweis sollte stets im Vergleich mit den klinisch erhobenen Daten interpretiert werden. Auffällige oder schwerwiegende Krankheitszustände werden selten von einer geringen Anzahl an Organismen verursacht. Ausnahmen stellen iatrogen stark verdünnte Patientenproben wie BAL und zellarme Materialien wie Liquor dar.

Alle drei in der Legionella-RT-PCR vermutlich falsch-positiv detektierten Proben gehörten zu klinisch unauffälligen Patienten. Da neben dem Vergleich anhand von Protokollen von Jonas et al. kein drittes, ähnlich sensitives alternatives Nachweisverfahren zur Verfügung stand, war der korrekte Sachverhalt letztlich nicht zu ermitteln.

Zu schwach-positiven Ergebnissen kann es auch bei der Anwendung hochsensitiver Verfahren schon im Initialstadium einer Infektion vor dem Auftreten klinischer Symptome sowie in der Ausheilungsphase kommen. Zudem kann auch ein mit niedrigen Erregerlasten assoziierter asymptomatischer Trägerstatus detektiert werden [106, 134].

#### VERGLEICH DES MTK-NACHWEISES MIT KOMMERZIELLEN PRODUKTEN

In Tabelle 16 wird die Sensitivität und Spezifität des MTK-Einzelnachweises mit Daten aus Studien über die TB-Mikroskopie bzw. die kommerziellen Systeme COBAS Amplicor und BDProbeTechET verglichen [109, 170, 171].

Dabei variieren die Ergebnisse der verschiedenen Studien erheblich. Auffällig ist jedoch eine stets hohe Spezifität bei schwankenden, z. T. unzureichenden Sensitivitäten. Die kommerziellen Tests unterlagen alle den In-House-PCR-Verfahren der verschiedenen Autoren (Daten nicht Inhalt der Tabelle) und wurden in den

Publikationen daher kritisch diskutiert. Das hier vorgestellte Multiplex-Verfahren wurde aus Kostengründen experimentell nicht direkt mit kommerziellen Verfahren sondern nur mit dem Goldstandard Kultur verglichen.

Methoden	Kultur	COBAS Amplicor	BDProbeTechET	diese RT-PCR
Sensitivität in %	61,5 <sup>3</sup>	45,5-66,3 <sup>1</sup> /76,9 <sup>2</sup> /78,0 <sup>3</sup>	86,2 <sup>3</sup>	100*
Spezifität in %	99,7 <sup>3</sup>	94,4 <sup>1</sup> /98,6 <sup>2</sup> /99,9 <sup>3</sup>	99,2/99,9 <sup>3</sup>	99,4*

**Tabelle 16: Sensitivitäts-/Spezifitätsvergleich des eigenen Verfahrens mit kommerziellen TB-PCRs**

<sup>1</sup> [171] Jan I. S., Hsueh P. R., Teng L. J., Lee L. N., Wang S. K., Shieh D. C., Luh K. T. Evaluation of the Roche COBAS AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis test für direct Detection of M. tuberculosis in respiratory specimens. *Abstract General Meeting American Society für Microbiology*. 1997, 97.551

<sup>2</sup> [109] Eing B. R., Becker A., Sohns A., Ringelmann R. Comparison of Roche Cobas Amplicor Mycobacterium tuberculosis Assay with In-House PCR and Culture for Detection of M. tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998, 36: 2023–2029.

<sup>3</sup> [170] Goessens W. H. F., de Man P., Koeleman J. G. M., Luijendijk A., te Witt R., Endtz H. P., van Belkum A. Comparison of the COBAS AMPLICOR MTB und BDProbeTec ET Assays für Detektion of Mycobacterium tuberculosis in Respiratory Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005, 43: 2563–2566.

\* Im Vergleich zu kulturellen Verfahren

Die Qualität und Präzision des hier präsentierten Real-Time-Verfahrens haben sich in den Ringversuchen 2007 und 2009 sechsmal bestätigt, dabei wurden immer 100 % der maximal vergebenen Punktzahl erreicht. Bemerkenswert sind hierbei die Ergebnisse des Ringversuchs *Tuberculosis* IV Nr. 424 (April 2008) mit 137 teilnehmenden Laboratorien. Nur 76,6 % aller Teilnehmer erreichten in ihren Ergebnissen 100 % Richtigkeit. Von allen Teilnehmern verwendeten 22,6 % das System von BDProbeTechET, 37,2 % das von Amplicor und 21,2 % In-House-RT-PCR-Systeme. Die Richtigkeitsquote von 100 % erreichten die Nutzer der kommerziellen RT-PCR Systeme wie BDProbeTechET oder Amplicor nur zu 80,6 % bzw. 66,7 %. Dagegen erzielten 99,3 % der Teilnehmer mit In-House-RT-PCRs wie diesem System die Richtigkeitsquote von 100 %.

#### KOSTENFAKTOR

Es gibt bisher keine weltweit verfügbaren und mit den notwendigen Zertifikaten versehenen kommerziellen Systeme, die neben MTK-Erregern auch andere Pneumonieerreger detektieren. Die Firma Prodesse Inc., USA, bietet einen

Kombinationskit für *C. pneumoniae* und *M. pneumoniae* mit dem Namen ProPneumo-1 Real Time für 47,50 € pro Probe. Für wissenschaftliche Zwecke ist außerdem in den USA der RUO (Research Use Only) PNEUMOPLEX-Kit erhältlich mit Kosten von umgerechnet ca. 52 € pro Probe; dieses System detektiert *B. pertussis*, *C. pneumoniae*, *L. micdadei*, *L. pneumophila*, *M. pneumoniae*.

Von der Firma Argene Inc., Frankreich, ist für den EU-Bereich der Chlamyde-Kit zugelassen, der *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *Legionella* spp. und *L. pneumophila* detektiert und 45,36 € kostet.

Für das hier vorgestellte Nachweissystem fielen im Laborbetrieb der Uniklinik Rostock für die eingesetzten Chemikalien ca. 5,80 € pro Probe an. Damit betrugen die Sachkosten des In-House-Verfahrens nur ca. 12 % der Kosten kommerzieller Kits. Für die Berechnung der tatsächlichen Kosten eines Routinebetriebs müssen noch die Investitions-, Personal- und Aufwandskosten für den Gebäudeunterhalt sowie etwaige Zinsdienste einkalkuliert werden.

#### FAKTOREN FÜR DEN ROUTINEBETRIEB

Ab Januar 2008 erfolgte schrittweise die Einführung der Duplex-RT-PCRs in die Routinediagnostik. Mehr als 900 Patientenproben mit Verdacht auf Mykobakterien-Infektion und ca. 1400 Patientenproben mit Verdacht auf Infektion durch atypische Pneumonieerreger wurden bis Februar 2009 untersucht. Neben den oben genannten finanziellen Aspekten soll besonders auf die Konsequenzen für die Routinediagnostik im Labor eingegangen werden. Vorteile liegen vor allem im Bereich der Einsparung von Arbeitszeit, Verbrauchsmaterialien und Patientenmaterial, sowie in einem verbesserten Arbeitsschutz.

Die Einsparung der Menge von (Probe- und) Patientenmaterial schon während der Aufreinigung spielt besonders für Patienten der Pädiatrie und Intensivmedizin eine Rolle. So kann die einzusendende Probemenge von Biopaten und Liquor minimalisiert werden. Die parallele Detektion auf einer Platte ist zeitsparend und für den Laborbetrieb gut umsetzbar.

Nach der Dekontamination und Aufreinigung besteht für das Personal nur eine sehr geringe Infektionsgefahr. Es findet keine offene Handhabung infektiöser Materialien

statt. Weiterhin wird das Personal nicht durch toxische oder kanzerogene Substanzen gefährdet.

Die RT-PCR ist eines der modernsten und sensitivsten Werkzeuge für die unmittelbare Detektion von Erregern; es ist geeignet für eine sichere Diagnose des Patienten, die Festlegung einer geeigneten kalkulierten Therapie und ggf. die Einleitung von hygienischen Maßnahmen. Mit der Einführung dieses Analyseverfahrens in die Routinediagnostik wurde ein Verfahren etabliert, das sich mit internationalen Qualitäts- und Sicherheitsstandards messen lässt und ein zeitgerechtes, zuverlässiges Detektionssystem darstellt.

## 5 Zusammenfassung

Pneumonien und Lungentuberkulosen gehören zu den häufigsten global registrierten Infektionserkrankungen mit zum Teil schweren, gegebenenfalls auch extrapulmonalen Krankheitsbildern. Die Differenzierung zwischen verschiedenen atypischen Pneumonieerregern, die ca. 20–30 % aller Pneumonien bewirken, ist klinisch schwierig. Der mikrobiologische Nachweis gestaltet sich aufgrund der Biologie der Erreger kompliziert und stellt damit noch immer eine diagnostische Herausforderung dar. Dies gilt auch für Erreger der Tuberkulose.

Kulturelle Verfahren haben bei diesen Erregern Nachteile in Form von weitreichenden Vorgaben für die Laborsicherheit, eine z. T. technisch aufwendige Durchführung sowie langer Bearbeitungszeiten von mindestens 3–7 Tagen (*Legionella* spp.) bis hin zu 2–12 Wochen (*M. tuberculosis*). Serologische Verfahren sind vergleichsweise weniger sensitiv, ggf. erst durch einen Titerverlauf nach Wochen beurteilbar oder im Fall der Mykobakterien gar nicht zur Diagnostik geeignet. Seit 1989 stehen Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken in Form der Polymerase-Kettenreaktion für den schnellen Genomnachweis zur Verfügung.

Diese Arbeit beschreibt ein Detektionssystem, welches zur Analyse der häufigsten atypischen Pneumonieerreger sowie für Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTK) in respiratorischen Materialien geeignet ist. Auf der Basis einer Real-Time-PCR mit TaqMan-Sonden wurde ein gepaartes Duplex-Verfahren entwickelt, welches *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Legionella* spp. sowie MTK-Bakterien detektiert und simultan zwischen den Erregern differenziert.

Die Analyse der drei Nachweispaaire

- *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex – humanes  $\beta$ -Globin-Gen (Inhibitionskontrolle)
- *Chlamydophila pneumoniae* – *Mycoplasma pneumoniae*
- *Legionella* spp. – *Legionella pneumophila*

erfolgt parallel auf einer 96-Kavitäten-Platte in einem Reaktionsablauf innerhalb von 75 min (vgl. Abbildung 7). Grundlage hierfür war die Anpassung der Primer und Sonden an ein für alle Reaktionen gleiches, generalisiertes Temperaturprofil.

In internen und externen Validierungen wurde das Detektionssystem ausgiebig hinsichtlich Sensitivität, Spezifität, Wiederholbarkeit, Linearität, Detektionsgrenzen und Kreuzreaktivität geprüft. Die Ergebnisse für die Sensitivität und Spezifität lagen durchschnittlich bei 98,7 % bzw. 99,8 %. Kreuzreaktionen wurden durch die Analyse von jeweils 70–80 Keimen des Respirationstrakts und phylogenetisch verwandten Erreger ausgeschlossen.

Das Verfahren erwies sich als äußerst zuverlässig und über Monate stabil reproduzierbar. Seit Januar 2007 erfolgte schrittweise die Einführung in die Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene an der Universitätsklinik Rostock. Hier ersetzte es die bisherigen PCR- und Hybridisierungstechniken durch die Vorteile hinsichtlich Quantifizierbarkeit, Schnelligkeit der Durchführung sowie Möglichkeit der Detektion von dualen Infektionen. Zudem ist im Vergleich zu kommerziellen Multiplex-Systemen eine Kostenreduktion bis zu 88 % möglich.

Zusammengefasst stellt das Verfahren einen äußerst schnellen, hochsensitiven und hochspezifischen Nachweis von Pneumonieerregern und MTK-Bakterien dar, der dem Kliniker die schnelle diagnostische Abklärung eines entsprechenden Syndroms ermöglicht und damit zur Einleitung einer adäquaten, spezifischen Therapie und ggf. notwendiger Hygienemaßnahmen verhilft. Dies wiederum kann die Krankheitsprogression sowie die Nebenwirkungen von Therapeutika und die Möglichkeit der Antibiotikaresistenzentwicklung reduzieren. Schließlich können so Patientenverweildauer und Arbeitszeit sowie Therapie- und Personalkosten eingespart werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. WHO, *The ten causes of death. Fact sheet No 310*. 2008  
URL: [http://www.premierheart.com/webapp/downloads/who\\_stats.pdf](http://www.premierheart.com/webapp/downloads/who_stats.pdf)  
19.20.2009
2. Niederlaender, E., *Statistics in focus – Population and social conditions - Causes of death in the EU*. 2006.
3. Al-Eidan, F.A., et al., *Use of a treatment protocol in the management of community-acquired lower respiratory tract infection*. J Antimicrob Chemother, 2000. **45**(3): p. 387-94.
4. Fine, M.J., et al., *Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia. A meta-analysis*. Jama, 1996. **275**(2): p. 134-41.
5. Hoffken, G., et al., *[Epidemiology, diagnosis, antimicrobial therapy and management of community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections in adults. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Respiratory Society, the German Society for Infectiology and the Competence Network CAPNETZ Germany]*. Pneumologie, 2009. **63**(10): p. e1-68.
6. WHO, *Global Tuberculosis Control 2008 – Surveillance, Planning, Financing*. 2008.URL:  
[http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2008/en/index.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/en/index.html),  
02.02.2010
7. Bandera, A., et al., *Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(6): p. 2213-8.
8. Wunderink, R.G. and G.W. Waterer, *Community-acquired pneumonia: pathophysiology and host factors with focus on possible new approaches to management of lower respiratory tract infections*. Infect Dis Clin North Am, 2004. **18**(4): p. 743-59, vii.
9. Strieter, R.M., J.A. Belperio, and M.P. Keane, *Host innate defenses in the lung: the role of cytokines*. Curr Opin Infect Dis, 2003. **16**(3): p. 193-8.
10. Mason, C.M. and S. Nelson, *Pulmonary host defenses and factors predisposing to lung infection*. Clin Chest Med, 2005. **26**(1): p. 11-7.
11. Fabel, H. und N. Konietzko, *Weißbuch Lunge*. 2005, Stuttgart: Thieme Verlag. 6-11, 36-44.
12. Galanski, M. und J. Freyschmidt, *Handbuch der diagnostischen Radiologie – Thorax*. 2003, Berlin: Springer. 248 ff.
13. Vergis, E.N., et al., *Azithromycin vs cefuroxime plus erythromycin for empirical treatment of community-acquired pneumonia in hospitalized patients: a prospective, randomized, multicenter trial*. Arch Intern Med, 2000. **160**(9): p. 1294-300.
14. Edelstein, P.H., et al., *In-vitro activity of levofloxacin against clinical isolates of Legionella spp, its pharmacokinetics in guinea pigs, and use in experimental Legionella pneumophila pneumonia*. J Antimicrob Chemother, 1996. **37**(1): p. 117-26.
15. Yu, V.L., et al., *Levofloxacin efficacy in the treatment of community-acquired legionellosis*. Chest, 2004. **125**(6): p. 2135-9.



16. Dunbar, L.M., et al., *Efficacy of 750-mg, 5-day levofloxacin in the treatment of community-acquired pneumonia caused by atypical pathogens*. Curr Med Res Opin, 2004. **20**(4): p. 555-63.
17. Brodhun, B., D. Altmann, und W.H. Haas, *Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2006, 2008*, Robert-Koch-Institut: Berlin. p. 96.
18. Knisley, C.V., et al., *Rapid and sensitive identification of Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 1985. **22**(5): p. 761-7.
19. Steingart, K.R., et al., *Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review*. Lancet Infect Dis, 2006. **6**(9): p. 570-81.
20. Burkhardt, F., *Mikrobiologische Diagnostik*. 1992, Stuttgart: Thieme. 153–157; 269–288; 309–334.
21. Stamm, W.E., R.B. Jones, und B.E. Batteiger, *Principles and Practice of Infectious Diseases*, in *Introduction to Chlamydial diseases*, G.L. Mandell, J.E. Bennett, and R. Dolin, Editors. 2005, Churchill Livingstone: Philadelphia. p. 2236.
22. Wright, H.R. und H.R. Taylor, *Clinical examination and laboratory tests for estimation of trachoma prevalence in a remote setting: what are they really telling us?* Lancet Infect Dis, 2005. **5**(5): p. 313-20.
23. Mills, G.D., M.R. Oehley, and B. Arrol, *Effectiveness of beta lactam antibiotics compared with antibiotics active against atypical pathogens in non-severe community acquired pneumonia: meta-analysis*. Bmj, 2005. **330**(7489): p. 456.
24. Robert Koch Institut, (2001) *Epidemiologisches Bulletin 14/2001 Volume*, DOI: PVKZ A 14273  
URL:[http://www.rki.de/cln\\_171/nn\\_195896/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2001/14\\_\\_01,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/14\\_01.pdf](http://www.rki.de/cln_171/nn_195896/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2001/14__01,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/14_01.pdf), 19.20.2009
25. Chirgwin, K., et al., *Infection with Chlamydia pneumoniae in Brooklyn*. J Infect Dis, 1991. **163**(4): p. 757-61.
26. Grayston, J.T., et al., *Chlamydia pneumoniae (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery*. Circulation, 1995. **92**(12): p. 3397-400.
27. Puolakkainen, M., et al., *Serological response to Chlamydia pneumoniae in patients with sarcoidosis*. J Infect, 1996. **33**(3): p. 199-205.
28. Mahbubani, M.H., et al., *Detection of Legionella with polymerase chain reaction and gene probe methods*. Mol Cell Probes, 1990. **4**(3): p. 175-87.
29. Dowell, S.F., et al., *Standardizing Chlamydia pneumoniae assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada)*. Clin Infect Dis, 2001. **33**(4): p. 492-503.
30. Honda, J., et al., *Clinical use of capillary PCR to diagnose Mycoplasma pneumonia*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(4): p. 1382-4.
31. Williamson, J., et al., *Laboratory diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection. 4. Antigen capture and PCR-gene amplification for detection of the Mycoplasma: problems of clinical correlation*. Epidemiol Infect, 1992. **109**(3): p. 519-37.

32. Clyde, W.A., Jr., *Clinical overview of typical Mycoplasma pneumoniae infections*. Clin Infect Dis, 1993. **17 Suppl 1**: p. S32-6.
33. Ishida, T., et al., *Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized patients: a 3-year prospective study in Japan*. Chest, 1998. **114**(6): p. 1588-93.
34. Marrie, T.J., et al., *Etiology of community-acquired pneumonia treated in an ambulatory setting*. Respir Med, 2005. **99**(1): p. 60-5.
35. Waites, K.B. und D.F. Talkington, *Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen*. Clin Microbiol Rev, 2004. **17**(4): p. 697-728, table of contents.
36. Ieven, M. und H. Goossens, *Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(2): p. 242-56.
37. Ponka, A., et al., *Questionable specificity of lipid antigen in the Mycoplasma pneumoniae complement fixation test in patients with extrapulmonary manifestations*. J Infect, 1981. **3**(4): p. 332-8.
38. Ruuskanen, O., et al., *Pneumonia in childhood: etiology and response to antimicrobial therapy*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1992. **11**(3): p. 217-23.
39. Watkins-Riedel, T., G. Stanek, and F. Daxboeck, *Comparison of SeroMP IgA with four other commercial assays for serodiagnosis of Mycoplasma pneumoniae pneumonia*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2001. **40**(1-2): p. 21-5.
40. Ginevra, C., et al., *Development and evaluation of Chlamylege, a new commercial test allowing simultaneous detection and identification of Legionella, Chlamydophila pneumoniae, and Mycoplasma pneumoniae in clinical respiratory specimens by multiplex PCR*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(7): p. 3247-54.
41. Templeton, K.E., et al., *Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(9): p. 4366-71.
42. Pereyre, S., et al., *First report of macrolide-resistant strains and description of a novel nucleotide sequence variation in the P1 adhesin gene in Mycoplasma pneumoniae clinical strains isolated in France over 12 years*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(11): p. 3534-9.
43. Chaudhry, R., et al., *Expression and immunological characterization of the carboxy-terminal region of the P1 adhesin protein of Mycoplasma pneumoniae*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(1): p. 321-5.
44. Dumke, R., et al., *Sensitive detection of Mycoplasma pneumoniae in human respiratory tract samples by optimized real-time PCR approach*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(8): p. 2726-30.
45. Benson, R.F. und B.S. Fields, *Classification of the genus Legionella* Semin Respir Infect, 1998. **13**: p. 90-99.
46. von Baum, H., et al., *Community-acquired Legionella pneumonia: new insights from the German competence network for community acquired pneumonia*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(9): p. 1356-64.
47. Murdoch, D.R., *Diagnosis of Legionella infection*. Clin Infect Dis, 2003. **36**(1): p. 64-9.

48. Cloud, J.L., et al., *Detection of Legionella species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(5): p. 1709-12.
49. Wellinghausen, N., C. Frost, und R. Marre, *Detection of legionellae in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(9): p. 3985-93.
50. Pruckler, J.M., et al., *Comparison of Legionella pneumophila isolates by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis: analysis from seven epidemic investigations*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(11): p. 2872-5.
51. Kool, J.L., et al., *Hospital characteristics associated with colonization of water systems by Legionella and risk of nosocomial legionnaires' disease: a cohort study of 15 hospitals*. Infect Control Hosp Epidemiol, 1999. **20**(12): p. 798-805.
52. Lueck, P.C., et al., *DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis to investigate a nosocomial pneumonia caused by Legionella bozemanii serogroup 1*. Appl. Environ. Microbiol., 1995. **61**(7): p. 2759-2761.
53. Neumeister, B., *Legionella infections: epidemiology, diagnostics, clinical aspects, and pathogenesis* Clinical Laboratory, 1996: p. 42: 715–729.
54. Patterson, W.J., et al., *Colonization of transplant unit water supplies with Legionella and protozoa: precautions required to reduce the risk of legionellosis*. J Hosp Infect, 1997. **37**(1): p. 7-17.
55. Arbeitsmedizin, B.f.A.u. (2005) *Technische Regel für Biologische Arbeitsstoffe 466. Einstufung von Bakterien (Bacteria) und Archebakterien (Archaea) in Risikogruppen*. pp. 33–193,  
URL: [http://www.baua.de/nn\\_15268/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf](http://www.baua.de/nn_15268/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf)
56. Benin, A.L., R.F. Benson, und R.E. Besser, *Trends in legionnaires disease, 1980-1998: declining mortality and new patterns of diagnosis*. Clin Infect Dis, 2002. **35**(9): p. 1039-46.
57. Marston, B.J., H.B. Lipman, und R.F. Breiman, *Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality*. Arch Intern Med, 1994. **154**(21): p. 2417-22.
58. Leroy, O., et al., *A five-year study of severe community-acquired pneumonia with emphasis on prognosis in patients admitted to an intensive care unit*. Intensive Care Med, 1995. **21**(1): p. 24-31.
59. Arancibia, F., et al., *Community-acquired pneumonia due to gram-negative bacteria and pseudomonas aeruginosa: incidence, risk, and prognosis*. Arch Intern Med, 2002. **162**(16): p. 1849-58.
60. El-Solh, A.A., et al., *Etiology of severe pneumonia in the very elderly*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(3 Pt 1): p. 645-51.
61. Singh, N., J.E. Stout, und V.L. Yu, *Prevention of Legionnaires' disease in transplant recipients: recommendations for a standardized approach*. Transpl Infect Dis, 2004. **6**(2): p. 58-62.
62. Breiman, R.F. and J.C. Butler, *Legionnaires' disease: clinical, epidemiological, and public health perspectives*. Semin Respir Infect, 1998. **13**(2): p. 84-9.
63. Jaresova, M., et al., *Legionella detection in oropharyngeal aspirates of transplant patients prior to surgery*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2006. **25**(1): p. 63-4.

64. Coletta, F.S. und A.M. Fein, *Radiological manifestations of Legionella/Legionella-like organisms*. Semin Respir Infect, 1998. **13**(2): p. 109-15.
65. Lowry, P.W. und L.S. Tompkins, *Nosocomial legionellosis: a review of pulmonary and extrapulmonary syndromes*. Am J Infect Control, 1993. **21**(1): p. 21-7.
66. Bemmer, P., et al., *Legionella pneumophila Arthritis: use of medium specific for Mycobacteria for isolation of L. pneumophila in culture of articular fluid specimens*. Clin Infect Dis, 2002. **35**(1): p. E6-7.
67. Gacouin, A., et al., *Severe pneumonia due to Legionella pneumophila: prognostic factors, impact of delayed appropriate antimicrobial therapy*. Intensive Care Med, 2002. **28**(6): p. 686-91.
68. Heath, C.H., D.I. Grove, und D.F. Looke, *Delay in appropriate therapy of Legionella pneumonia associated with increased mortality*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1996. **15**(4): p. 286-90.
69. Fernandez, J.A., et al., *Clinical study of an outbreak of Legionnaire's disease in Alcoy, Southeastern Spain*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2002. **21**(10): p. 729-35.
70. Mykietiuik, A., et al., *Clinical outcomes for hospitalized patients with Legionella pneumonia in the antigenuria era: the influence of levofloxacin therapy*. Clin Infect Dis, 2005. **40**(6): p. 794-9.
71. Bornstein, N., et al., *Pleural infection caused by Legionella anisa*. J Clin Microbiol, 1989. **27**(9): p. 2100-1.
72. Wilkinson, H.W., et al., *Legionella birminghamensis sp. nov. isolated from a cardiac transplant recipient*. J Clin Microbiol, 1987. **25**(11): p. 2120-2.
73. Thacker, W.L., et al., *Legionella cincinnatiensis sp. nov. isolated from a patient with pneumonia*. J Clin Microbiol, 1988. **26**(3): p. 418-20.
74. Thacker, W.L., et al., *Second serogroup of Legionella feeleei strains isolated from humans*. J Clin Microbiol, 1985. **22**(1): p. 1-4.
75. Griffith, M.E., et al., *First isolation of Legionella gormanii from human disease*. J Clin Microbiol, 1988. **26**(2): p. 380-1.
76. Wilkinson, H.W., et al., *Second serogroup of Legionella hackeliae isolated from a patient with pneumonia*. J Clin Microbiol, 1985. **22**(4): p. 488-9.
77. Vinh, D.C., et al., *Legionella jordanis lower respiratory tract infection: case report and review*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(7): p. 2321-3.
78. Thacker, W.L., et al., *Legionella lansingensis sp. nov. isolated from a patient with pneumonia and underlying chronic lymphocytic leukemia*. J Clin Microbiol, 1992. **30**(9): p. 2398-401.
79. McKinney, R.M., et al., *Legionella longbeachae species nova, another etiologic agent of human pneumonia*. Ann Intern Med, 1981. **94**(6): p. 739-43.
80. Wilkinson, H.W., et al., *Fatal Legionella maceachernii pneumonia*. J Clin Microbiol, 1985. **22**(6): p. 1055.
81. Tang, P.W., S. Toma, und L.G. MacMillan, *Legionella oakridgensis: laboratory diagnosis of a human infection*. J Clin Microbiol, 1985. **21**(3): p. 462-3.
82. Benson, R.F., et al., *Legionella sainthelensi serogroup 2 isolated from patients with pneumonia*. Res Microbiol, 1990. **141**(4): p. 453-63.



83. Thacker, W.L., et al., *Legionella tucsonensis* sp. nov. isolated from a renal transplant recipient. J Clin Microbiol, 1989. **27**(8): p. 1831-4.
84. Edelstein, P.H., et al., *Legionella wadsworthii* species nova: a cause of human pneumonia. Ann Intern Med, 1982. **97**(6): p. 809-13.
85. Helbig, J.H., et al., *Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial legionnaires' disease*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(2): p. 838-40.
86. Plouffe, J.F., et al., *Reevaluation of the definition of Legionnaires' disease: use of the urinary antigen assay. Community Based Pneumonia Incidence Study Group*. Clin Infect Dis, 1995. **20**(5): p. 1286-91.
87. Zuravleff, J.J., et al., *Diagnosis of Legionnaires' disease. An update of laboratory methods with new emphasis on isolation by culture*. Jama, 1983. **250**(15): p. 1981-5.
88. Kallings, I. und K. Nordstrom, *The pattern of immunoglobulins with special reference to IgM in Legionnaires' disease patients during a 2 year follow-up period*. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A, 1983. **255**(1): p. 27-32.
89. Edelstein, P.H., R.D. Meyer, und S.M. Finegold, *Laboratory diagnosis of Legionnaires' disease*. Am Rev Respir Dis, 1980. **121**(2): p. 317-27.
90. Fang, G.D., et al., *New and emerging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy. A prospective multicenter study of 359 cases*. Medicine (Baltimore), 1990. **69**(5): p. 307-16.
91. Boswell, T.C., L.E. Marshall, und G. Kudesia, *False-positive legionella titres in routine clinical serology testing detected by absorption with campylobacter: implications for the serological diagnosis of legionnaires' disease*. J Infect, 1996. **32**(1): p. 23-6.
92. Musso, D. und D. Raoult, *Serological cross-reactions between Coxiella burnetii and Legionella micdadei*. Clin Diagn Lab Immunol, 1997. **4**(2): p. 208-12.
93. Guerrero, C., et al., *Comparison of diagnostic sensitivities of three assays (Bartels enzyme immunoassay [EIA], Biotest EIA, and Binax NOW immunochromatographic test) for detection of Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in urine*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(1): p. 467-8.
94. Diederer, B.M., et al., *Evaluation of two immunochromatographic tests (ImmunoCard Toxins A&B, Xpect C. difficile Toxin A&B) and PCR for the detection of Clostridium difficile toxins in faecal samples*. J Infect, 2007. **54**(6): p. e251-2.
95. Dominguez, J.A., et al., *Comparison of the Binax Legionella urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotest Legionella Urin antigen EIA for detection of Legionella antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(9): p. 2718-22.
96. Kazandjian, D., R. Chiew, und G.L. Gilbert, *Rapid diagnosis of Legionella pneumophila serogroup 1 infection with the Binax enzyme immunoassay urinary antigen test*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(4): p. 954-6.
97. Dominguez, J.A., et al., *Comparison of radioimmunoassay and enzyme immunoassay kits for detection of Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(6): p. 1627-9.

98. Yzerman, E.P., et al., *Sensitivity of three urinary antigen tests associated with clinical severity in a large outbreak of Legionnaires' disease in The Netherlands*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(9): p. 3232-6.
99. She, R.C., et al., *Limited applicability of direct fluorescent-antibody testing for Bordetella sp. and Legionella sp. specimens for the clinical microbiology laboratory*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(7): p. 2212-4.
100. Hayden, R.T., et al., *Direct detection of Legionella species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(7): p. 2618-26.
101. Saiki, R.K., et al., *Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes*. Nature, 1986. **324**(6093): p. 163-6.
102. Newton, C.R. und A. Graham, *PCR*. 1994, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH. 25-66.
103. Thiemann, F., P.M. Cullen, und H.G. Klein, *Leitfaden Molekulare Diagnostik*. 2006, Weinheim WILEY-VCH Verlag. 54-59; 61-85; 89-107; 219-220.
104. Schild, T.A. *7700 SDS Workshop - Einführung in die Real-Time Taqman PCR Technologie*. 1998 [cited 14.11.2009]; Available from: <http://www.core-facility.uni-freiburg.de/lc480/lc480obj/sdsman>.
105. Eisenach, K.D., et al., *Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis, 1990. **161**(5): p. 977-81.
106. Kox, L.F., et al., *A more reliable PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples*. J Clin Microbiol, 1994. **32**(3): p. 672-8.
107. Forbes, B.A. und K.E. Hicks, *Ability of PCR assay to identify Mycobacterium tuberculosis in BACTEC 12B vials*. J Clin Microbiol, 1994. **32**(7): p. 1725-8.
108. Schirm, J., L.A. Oostendorp, und J.G. Mulder, *Comparison of Amplicor, in-house PCR, and conventional culture for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(12): p. 3221-4.
109. Eing, B.R., et al., *Comparison of Roche Cobas Amplicor Mycobacterium tuberculosis assay with in-house PCR and culture for detection of M. tuberculosis*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(7): p. 2023-9.
110. Takahashi, T. und T. Nakayama, *Novel technique of quantitative nested real-time PCR assay for Mycobacterium tuberculosis DNA*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(3): p. 1029-39.
111. Bennedsen, J., et al., *Utility of PCR in diagnosing pulmonary tuberculosis*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(6): p. 1407-11.
112. Groenen, P.M., et al., *Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobacterium tuberculosis; application for strain differentiation by a novel typing method*. Mol Microbiol, 1993. **10**(5): p. 1057-65.
113. Thierry, D., et al., *Characterization of a Mycobacterium tuberculosis insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(12): p. 2668-73.
114. Frothingham, R., *Differentiation of strains in Mycobacterium tuberculosis complex by DNA sequence polymorphisms, including rapid identification of M. bovis BCG*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(4): p. 840-4.

115. Cave, M.D., et al., *IS6110: conservation of sequence in the Mycobacterium tuberculosis complex and its utilization in DNA fingerprinting*. Mol Cell Probes, 1991. **5**(1): p. 73-80.
116. Klaassen, C.H., et al., *Quantification of human DNA in feces as a diagnostic test for the presence of colorectal cancer*. Clin Chem, 2003. **49**(7): p. 1185-7.
117. Graz, T.U. *Database of Fluorescent Dyes, Properties and Applications*. [cited 14.11.2009]; Available from: <http://www.fluorophores.tugraz.at/>.
118. Biosystems, A. *TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol*. 1998 [cited 14.11.2009]; Available from: <http://sequest.niboch.nsc.ru/Manuals/tagman.pdf>.
119. Tong, C.Y. und M. Sillis, *Detection of Chlamydia pneumoniae and Chlamydia psittaci in sputum samples by PCR*. J Clin Pathol, 1993. **46**(4): p. 313-7.
120. Talkington, D.F., et al., *Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection in autopsy and open-lung biopsy tissues by nested PCR*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(4): p. 1151-3.
121. Jonas, D., et al., *Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of legionellae in bronchoalveolar fluid*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(5): p. 1247-52.
122. Medlin, L., et al., *The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions*. Gene, 1988. **71**(2): p. 491-9.
123. Rabenau, H.F., et al., *Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology*. J Clin Virol, 2007. **40**(2): p. 93-8.
124. Rabenau, H.F. *Verfahrensanleitung zur Methodenvalidierung, Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Version A*. 2006 16.08.2006 [cited 19.01.2010]; 1-23]. Available from: [http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:Ox6usbTuFpUJ:www.dach-gmbh.de/DACHDok/Doks%252025\\_08\\_06/Musteranweisung%2520Validierung%2520Virusdiagnostik.pdf+Muster+VA+aus+dem+Version:+A+Institut+f%C3%BCr+Medizinische+Virologie+Universit%C3%A4tsklinikum+Frankfurt,+Paul+Ehrlich+Str.+40,+60596+Frankfurt&hl=de&gl=ch&sig=AHIEtbRK1Niyly25D5Hhr5WgEpmpr9nP9g](http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:Ox6usbTuFpUJ:www.dach-gmbh.de/DACHDok/Doks%252025_08_06/Musteranweisung%2520Validierung%2520Virusdiagnostik.pdf+Muster+VA+aus+dem+Version:+A+Institut+f%C3%BCr+Medizinische+Virologie+Universit%C3%A4tsklinikum+Frankfurt,+Paul+Ehrlich+Str.+40,+60596+Frankfurt&hl=de&gl=ch&sig=AHIEtbRK1Niyly25D5Hhr5WgEpmpr9nP9g).
125. Wirth, M., et al., *Detection of mycoplasma contaminations by the polymerase chain reaction*. Cytotechnology, 1994. **16**(2): p. 67-77.
126. Biosystems, A. *Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays*. 2006 [cited 20.01.2010]; Available from: [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_040377.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_040377.pdf).
127. Khanna, M., et al., *The pneumoplex assays, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay that allows simultaneous detection of five organisms, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae, Legionella pneumophila, Legionella micdadei, and Bordetella pertussis, and its real-time counterpart*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(2): p. 565-71.
128. Tuuminen, T., P. Palomaki, and J. Paavonen, *The use of serologic tests for the diagnosis of chlamydial infections*. J Microbiol Methods, 2000. **42**(3): p. 265-79.

129. Kumar, S. und M.R. Hammerschlag, *Acute respiratory infection due to Chlamydia pneumoniae: current status of diagnostic methods*. Clin Infect Dis, 2007. **44**(4): p. 568-76.
130. Yuen, K.Y., et al., *Use of PCR in routine diagnosis of treated and untreated pulmonary tuberculosis*. J Clin Pathol, 1993. **46**(4): p. 318-22.
131. Schluger, N.W., et al., *Clinical utility of the polymerase chain reaction in the diagnosis of infections due to Mycobacterium tuberculosis*. Chest, 1994. **105**(4): p. 1116-21.
132. Shankar, P., et al., *Identification of Mycobacterium tuberculosis by polymerase chain reaction*. Lancet, 1990. **335**(8686): p. 423.
133. Prabhakar, S., et al., *Use of the hupB gene encoding a histone-like protein of Mycobacterium tuberculosis as a target for detection and differentiation of M. tuberculosis and M. bovis*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(6): p. 2724-32.
134. Beige, J., et al., *Clinical evaluation of a Mycobacterium tuberculosis PCR assay*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(1): p. 90-5.
135. Hermans, P.W., et al., *Insertion element IS986 from Mycobacterium tuberculosis: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(9): p. 2051-8.
136. Lee, B.W., et al., *DNA amplification by the polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculous meningitis. Comparison of protocols involving three mycobacterial DNA sequences, IS6110, 65 kDa antigen, and MPB64*. J Neurol Sci, 1994. **123**(1-2): p. 173-9.
137. Soini, H., et al., *Comparison of amplicor and 32-kilodalton PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis from sputum specimens*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(7): p. 1829-30.
138. Gillman, L.M., et al., *Identification of Mycobacterium species by multiple-fluorescence PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(9): p. 3085-91.
139. Gazouli, M., et al., *Assessment of mycobacterial, propionibacterial, and human herpesvirus 8 DNA in tissues of greek patients with sarcoidosis*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(8): p. 3060-3.
140. Liu, P.Y., et al., *Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by a simplified nested amplification protocol*. Neurology, 1994. **44**(6): p. 1161-4.
141. Shankar, P., et al., *Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction*. Lancet, 1991. **337**(8732): p. 5-7.
142. van Soolingen, D., et al., *Occurrence and stability of insertion sequences in Mycobacterium tuberculosis complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis*. J Clin Microbiol, 1991. **29**(11): p. 2578-86.
143. Barouni, A.S., et al., *A pncA polymorphism to differentiate between Mycobacterium bovis and Mycobacterium tuberculosis*. Mol Cell Probes, 2004. **18**(3): p. 167-70.
144. Mohamed, A.M., et al., *Temperature-mediated heteroduplex analysis for detection of pncA mutations associated with pyrazinamide resistance and differentiation between Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis by denaturing high- performance liquid chromatography*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(3): p. 1016-23.



145. Scorpio, A. und Y. Zhang, *Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus*. Nat Med, 1996. **2**(6): p. 662-7.
146. Chimara, E., L. Ferrazoli, und S.C. Leao, *Mycobacterium tuberculosis complex differentiation using gyrB-restriction fragment length polymorphism analysis*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2004. **99**(7): p. 745-8.
147. Sreevatsan, S., et al., *Identification of a polymorphic nucleotide in oxyR specific for Mycobacterium bovis*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(8): p. 2007-10.
148. Haas, W.H., et al., *Molecular analysis of katG gene mutations in strains of Mycobacterium tuberculosis complex from Africa*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(7): p. 1601-3.
149. Mishra, A., et al., *Direct detection and identification of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis in bovine samples by a novel nested PCR assay: correlation with conventional techniques*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(11): p. 5670-8.
150. Loens, K., et al., *Two quality control exercises involving nucleic acid amplification methods for detection of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydophila pneumoniae and carried out 2 years apart (in 2002 and 2004)*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(3): p. 899-908.
151. Raggam, R.B., et al., *Single-run, parallel detection of DNA from three pneumonia-producing bacteria by real-time polymerase chain reaction*. J Mol Diagn, 2005. **7**(1): p. 133-8.
152. Pinar, A., et al., *Rapid detection of bacterial atypical pneumonia agents by multiplex PCR*. Cent Eur J Public Health, 2004. **12**(1): p. 3-5.
153. McDonough, E.A., et al., *A multiplex PCR for detection of Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae, Legionella pneumophila, and Bordetella pertussis in clinical specimens*. Mol Cell Probes, 2005. **19**(5): p. 314-22.
154. Wang, Y., et al., *A multiplex PCR-based reverse line blot hybridization (mPCR/RLB) assay for detection of bacterial respiratory pathogens in children with pneumonia*. Pediatr Pulmonol, 2008. **43**(2): p. 150-9.
155. Welti, M., et al., *Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect Chlamydia pneumoniae, Legionella pneumophila and Mycoplasma pneumoniae in respiratory tract secretions*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2003. **45**(2): p. 85-95.
156. Apfalter, P., et al., *Comparison of a new quantitative ompA-based real-Time PCR TaqMan assay for detection of Chlamydia pneumoniae DNA in respiratory specimens with four conventional PCR assays*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(2): p. 592-600.
157. Madico, G., et al., *Touchdown enzyme time release-PCR for detection and identification of Chlamydia trachomatis, C. pneumoniae, and C. psittaci using the 16S and 16S-23S spacer rRNA genes*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(3): p. 1085-93.
158. Tondella, M.L., et al., *Development and evaluation of real-time PCR-based fluorescence assays for detection of Chlamydia pneumoniae*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(2): p. 575-83.

159. Reischl, U., et al., *Rapid and standardized detection of Chlamydia pneumoniae using LightCycler real-time fluorescence PCR*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2003. **22**(1): p. 54-7.
160. Rantakokko-Jalava, K. und J. Jalava, *Development of conventional and real-time PCR assays for detection of Legionella DNA in respiratory specimens*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(8): p. 2904-10.
161. Garin, D., et al., *Diagnostic moleculaire en pathologie infectieuse: interet d'un diagnostic multiplex dans les pneumopathies atypiques*. Elsevier, 1999.
162. Stralin, K., et al., *Design of a multiplex PCR for Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Mycoplasma pneumoniae and Chlamydophila pneumoniae to be used on sputum samples*. Apmis, 2005. **113**(2): p. 99-111.
163. Loens, K., et al., *Development of real-time multiplex nucleic acid sequence-based amplification for detection of Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae, and Legionella spp. in respiratory specimens*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(1): p. 185-91.
164. Dooley, K.E., et al., *Empiric treatment of community-acquired pneumonia with fluoroquinolones, and delays in the treatment of tuberculosis*. Clin Infect Dis, 2002. **34**(12): p. 1607-12.
165. Templeton, K.E., et al., *Improved diagnosis of the etiology of community-acquired pneumonia with real-time polymerase chain reaction*. Clin Infect Dis, 2005. **41**(3): p. 345-51.
166. Juven, T., et al., *Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children*. Pediatr Infect Dis J, 2000. **19**(4): p. 293-8.
167. Kong, F., et al., *Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay to identify 23 Streptococcus pneumoniae polysaccharide vaccine serotypes*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(5): p. 1887-91.
168. Kolk, A.H., et al., *Detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system*. J Clin Microbiol, 1992. **30**(10): p. 2567-75.
169. Martinez, M., et al., *Impact of laboratory cross-contamination on molecular epidemiology studies of tuberculosis*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(8): p. 2967-9.
170. Goessens, W.H., et al., *Comparison of the COBAS AMPLICOR MTB and BDProbeTec ET assays for detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(6): p. 2563-6.
171. Jan, I.S., et al., *Evaluation of the Roche COBAS AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis test für direct Detection of M. tuberculosis in respiratory specimens in General Meeting American Society für Microbiology*. 1997, Abstr Gen Meet Am Soc Microbiol. .

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ATCC	american type culture collection
BCYE	Buffered charcoal yeast extract
BLAST	basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CAP	community acquired pneumonia
CAPNET	Kompetenznetz ambulant erworbene Pneumonie
CFU	colony forming unit
COPD	chronisch obstructive pulmonary disease
CP	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>
CRP	C-reaktives Protein
C <sub>t</sub>	Threshold-Cycle
DEIA	DNA enzyme immuno assay
DIF	Direkte Immunofluoreszenz
DNA	desoxyribonucleinacid
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethlyendiamintetraacetat
EIA	enzyme immuno assay
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
et al.	et alteri
FAM	6-Carboxyl Fluorescein (Fluoreszenzfarbstoff)
FET	Fluoreszenz-Energietransfer-Effekts
GE	genome equivalent
GVPC-Medium	Glycerin-Vancomycin-Polymixin-Cyclohexamid-Medium
ICT	Immunochromatografischer Test
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgA, IgG, IgM	Immunglobulin A, G, M
IS6110-Element	Insertionselement 6110
KBR	Komplementbindungsreaktion
LC	LightCycler (PCR-Instrument von Roche)
LP	<i>Legionella penumophila</i>
MIF	Mikro-Immuno-Fluoreszenz
mip	macrophage infectivity potentiator
MOTT	<i>Mycobacteria other than tuberculosis</i>
MP	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
MTK	<i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplex
NAP	nosocomial acquired pneumonia
NASBA	nucleic acid sequence based amplification
NAT	Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken
OD	optische Dichte
ompA	major outer membrane protein

PACT	Polymyxin B, Amphotericin B, Carbenicillin, Trimethoprim
PCR	polymerase chain reaction
PPLO	pleuropneumonia-like organisms
Rkt	Reaktion
RNA	ribonucleinacid
ROX	(Fluoreszenzfarbstoff )
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Real-Time-PCR
RUO	Research Use Only
S3	Labor Schutzstufe 3
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
spp.	species
SSO	Sequenz spezifische Oligonukleotid-Sonden
SYBR-Green	(Fluoreszenzfarbstoff)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TB	Tuberkulose
TE	Tris-EDTA
T <sub>m</sub>	thermodynamischer Schmelzpunkt
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Unit
VIC	(Fluoreszenzfarbstoff)
YY	Yakima Yellow (Fluoreszenzfarbstoff)

## 8 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung von Pneumonieerregern .....</i>	<i>7</i>
<i>Abbildung 2: Röntgen-Thoraxaufnahme p. a. einer 32-jährigen TB-Patientin .....</i>	<i>9</i>
<i>Abbildung 3: CT-Thorax-Aufnahme eines 29-jährigen Tuberkulosepatienten.....</i>	<i>10</i>
<i>Abbildung 4: Relative Anteile der Vertreter des M.-tuberculosis-Komplexes in symptomatischen MTK- bedingten Atemwegserkrankungen in Deutschland (Stand 2006).....</i>	<i>11</i>
<i>Abbildung 5: Speziesspezifische Häufigkeit von Mykobakterien in zu untersuchenden Patientenmaterialien am Universitätsklinikum Rostock .....</i>	<i>12</i>
<i>Abbildung 6: FET-Effekt bei TaqMan-Sonden.....</i>	<i>26</i>
<i>Abbildung 7: Schematische Konzeptübersicht des Multiplex-Analysesystems.....</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 8: Graphische Darstellung von Zielgenen und Amplifikaten .....</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 9: Temperaturprofil der RT-PCR .....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 10: Schmelzkurven von M. pneumoniae-Primern .....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 11: Amplifikate im Elektrophoresegel .....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 12: Untersuchung des Matrix-Effekts.....</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 13: Fluoreszenzmaxima von FAM und Yakima Yellow .....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 14: Duale Detektion am Beispiel von Verdünnungsreihen .....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 15: Schema der verwendeten Sonden und Primer beim Legionellen-Nachweis.....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 16: Darstellung der Linearität am Beispiel von C. pneumoniae und M. pneumoniae über den Zeitraum von sechs Monaten .....</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 17: Kreuzreaktionstestung vom MTK-Nachweis .....</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 18: Effizienzparameter beim MTK-Nachweis .....</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 19: Röntgenaufnahme p. a. eines 4-jährigen Patienten mit akuter Mykoplasmenpneumonie (bei Aufnahme) .....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 20: Röntgenaufnahme p. a. eines 4-jährigen Patienten nach akuter Mykoplasmenpneumonie, Verlaufskontrolle am 11 Tag nach Aufnahme .....</i>	<i>76</i>

## 9 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Primer und Sonden</i>	39
<i>Tabelle 2: Standorte für die einzelnen Arbeitsschritte der Experimentvorbereitung</i>	41
<i>Tabelle 3: Reaktionsansatz Monoplex-RT-PCR</i>	41
<i>Tabelle 4: Reaktionsansatz Duplex-RT-PCR</i>	41
<i>Tabelle 5: Reaktionsansatz Legionellen-RT-PCR</i>	42
<i>Tabelle 6: Thermodynamische Schmelzpunkte von Primern, Sonden und Amplikons</i>	50
<i>Tabelle 7: Legionellen und nah verwandte Bakterienarten</i>	59
<i>Tabelle 8: Sensitivität und Spezifität</i>	62
<i>Tabelle 9: Nachweisgrenzen der spezifischen RT-PCR</i>	64
<i>Tabelle 10: Testung von sechs Legionella-Spezies mit photometrisch gleichem DNA-Gehalt</i>	64
<i>Tabelle 11: Bestimmung der Präzision der verschiedenen Nukleinsäurenachweise</i>	66
<i>Tabelle 12: MOTT und Mykobakterien-ähnliche Stämme</i>	68
<i>Tabelle 13: Bakterien- und Pilzstämmen der Spezifitäts- und Kreuzreaktionsbestimmung</i>	72
<i>Tabelle 14: Vergleich von Real-Time-PCR und Kultur</i>	79
<i>Tabelle 15: Vergleich von Multiplex-Methoden zum Nukleinsäurenachweis von Pneumonieerregern</i>	83
<i>Tabelle 16: Sensitivitäts-/Spezifitätsvergleich des eigenen Verfahrens mit kommerziellen TB-PCRs</i>	91

# 10 Materialübersicht und Herstellerverzeichnis

## Geräte und Hilfsmittel

ABI Prism 7000 Detector	Fa. Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
ABI PRISM Optical Adhesive Cover	Fa. Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
BioPhotometer	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Brutschrank	Fa. Heraeus, Hanau
Flachgelelektrophoreseeinheit	Fa. Biometra, Göttingen
Gel-Dokumentationsanlage	Fa. Intas, Göttingen
Heizblock	Fa. Stuart Scientific, Stone, UK
Mastercycler ep realplex	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
MicroAmp Optical 96-Well-Reaction-Plate	Fa. Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
MicroAmp Optical Caps	Fa. Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
MicroAmp Optical Tubes	Fa. Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Micro-Centrifuge II GMC 160	Fa. NeoLab, Heidelberg
NucliSENS easy MAG-Extraktionsautomat	Fa. bioMérieux /Hitachi, Wien
Opticon 2	Fa. Bio-Rad Laboratories Hercules, USA
Picodrop Spectrophotometer	Fa. Picodrop Limited, Saffron Walden, UK
Primer-Express (Software)	Fa. Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Sicherheitswerkbank Klasse II Typ, Hera Safe KS 12	Fa. Heraeus, Hanau
StepOnePlus-Instrument	Fa. Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Vortex Reax 2000	Fa. Heidolph, Schwabach
Zentrifuge Cenrifuge 5415C	Fa. Eppendorf AG, Hamburg

## Chemikalien

Bartels EIA	Fa. Intracel, Frederick, MD, USA
BacT-ALERT	Fa. bioMérieux, Wien
Binax NOW	Fa. Binax, Portland, Maine, USA
Biotest EIA	Fa. Biotest AG, Dreieich
Chlamylege-Kit	Fa. Argene Inc., Frankreich
dNTP-Satz (je 100µmol)	Fa. Q Biogene, Carlsbad, USA
Ethanol 70 %ig absolut	Fa. Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid (1 % Lösung in Wasser)	Fa. Merck, Darmstadt
Eurogentec qPCR Mastermix	Fa. Eurogentech, Seraing, Belgien
Eurogentec qPCR Mastermix Plus Low ROX	Fa. Eurogentech, Seraing, Belgien
HotStarTaq-DNA-Polymerase 250U/1000U	Fa. Qiagen, Hilden
Löwenstein-Jensen-Medium	Fa. Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
MB-Wasser	Fa. Roth, Nürnberg
Oligonukleotide,	Fa. Eurogentech, Seraing, Belgien,
	Fa. Tib Molbiol, Berlin
pCRII-TOPO-Plasmide	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
PNEUMOPLEX-Kit	Fa. Prodesse Inc., USA
ProPneumo-1 Real Time	Fa. Prodesse Inc., USA
QIAamp DNA Mini Kit 50/250	Fa. Qiagen, Hilden
Quantifast Probe PCR + ROX Vial Kit	Fa. Qiagen, Hilden
Quantifast SYBR Green PCR Kit	Fa. Qiagen, Hilden,
QuantiFeron-TB-Gold-in-Tube-Test	Fa. Cellestis, Melbourne, Australia
Rapid U test	Fa. Diamondial, Sees, France
SD Bioline Legionella urinary antigen test	Fa. SD Bioline Inc., Kyonggi-do, Korea
Stonebrink-Medium	Fa. Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
TaqMan 2X Universal PCR Master Mix No	Fa. Applied Biosystems, Foster City, CA,
AmpEraseUNG	USA



# 11 Anhang

## 11.1 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Dr. Andreas Podbielski möchte ich herzlich für die Themenvergabe und seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danken. Durch ihn ist dieses Projekt erst möglich geworden. Ich danke Herrn Dr. Christian Aepinus für die sorgfältige Betreuung meiner Arbeit, die gute Kooperation und die Vielzahl wichtiger Hinweise und Anregungen. Er hat mir vertrauensvoll viel Spielraum und Freiheit gelassen und meine Pläne kompetent und fachlich unterstützt.

Weiterer Dank für die zur Verfügung gestellten Patientenproben und Bakterienkulturen gilt Dr. Andreas Essig vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Ulm, Dr. Christian Lück vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus der TU Dresden, Dr. Konrad Sachse vom Institut für Molekulare Pathogenese (IMP) Jena, Prof. Dr. Udo Reischl, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinik Regensburg sowie Dr. Elvira Richter und Prof. Dr. Sabine Rüscher-Gerdes vom Nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien, Forschungszentrum Borstel.

Herrn Prof. Dr. Karlheinz Hauenstein, Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universität Rostock, möchte ich herzlich für die zur Verfügung gestellten Röntgen- und CT-Bilder danken, ebenso wie Dr. Katja Kloker und Cornelia Rösler für die Hilfe bei der Interpretation und Beschreibung. Bei PD Dr. med. Carl Friedrich Classen, Abteilung für Allgemeine Pädiatrie mit Nephrologie, Onkologie und Neonatologie der Kinder- und Jugendklinik, Universität Rostock möchte ich mich für die Details zum dargestellten Patientenfall bedanken.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Manuela Schützke und Sabine Spangenberg möchte ich für ihre tatkräftige und praktische Unterstützung danken.

## 11.2Thesen

- 1) Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines kombinierten, vereinheitlichten Detektionssystems für MTK-Bakterien und die wichtigsten atypischen respiratorischen Erregern *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* und *Legionella* spp. inkl. *L. pneumophila* über ein Real-Time-PCR-Verfahren.
- 2) Ein weiterer wichtiger Baustein war die Integration einer Inhibitionskontrolle durch den Nachweis des humanen  $\beta$ -Globins.
- 3) Die Entwicklungsschritte beinhalteten:
  - die Entwicklung, Anwendung und Optimierung der generierten Primer und Sonden in praktischen Experimenten
  - die Angleichung der Amplifikationsbedingungen unter Berücksichtigung der thermodynamischen Schmelzpunkte
  - eine weitgehende Kopplung der Erregernachweise zur Einsparung von Arbeitszeit, Personal und Material ohne Sensitivitätsverlust
- 4) Zuletzt sollte die Validierung und Etablierung des Systems und die Testung einer Bandbreite anderer respiratorischer Erreger und Patientenproben unter der Berücksichtigung folgender Parameter erfolgen: Linearität, positiver prädiktiver Wert (PPV), negativer prädiktiver Wert (NPV), Präzision, Reproduzierbarkeit, Richtigkeit, Sensitivität und Spezifität.
- 5) Nach diesem letzten Schritt sollte das Detektionssystem langfristig in der Lage sein, die bisherigen Testverfahren für die genannten Erreger im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Rostock vollständig zu ersetzen.

### 11.3 Eidesstattliche Erklärung

Die vorgelegte Dissertation wurde weder vorher noch gleichzeitig bei einer anderen Fakultät oder Universität vorgelegt. Ich erkläre an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht und die von den Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, 07.12.2011

Christina Anja Wolkowicz